

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation de Cdk11, une nouvelle Cdk impliquée dans la régulation de la transcription, dans le modèle levure *Schizosaccharomyces pombe*

Mullier, Caroline

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**CARACTERISATION DE CDK11, UNE NOUVELLE CDK IMPLIQUEE DANS LA  
REGULATION DE LA TRANSCRIPTION, DANS LE MODELE LEVURE  
*SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Caroline MULLIER

Janvier 2009

## Caractérisation de Cdk11, une nouvelle Cdk impliquée dans la régulation de la transcription, dans le modèle levure *Schizosaccharomyces pombe*

MULLIER Caroline

### Résumé

Les Cdks sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription. La kinase Cdk11 est phylogénétiquement reliée aux Cdks « transcriptionnelles » qui phosphorylent le domaine C-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II. Le gène *cdk11* est présent chez tous les eucaryotes à l'exception de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce mémoire, nous avons étudié et caractérisé Cdk11 chez la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe*.

Chez les eucaryotes supérieurs, deux isoformes sont détectées: Cdk11<sup>p58</sup>, impliquée dans la régulation du fuseau mitotique est exprimée uniquement durant la phase G2/M, et Cdk11<sup>p110</sup>, qu'une série d'évidences implique dans la régulation de la transcription et/ou dans l'épissage, dont l'expression est constitutive. Le génome de *S. pombe* contient une séquence apparentée à Cdk11 encodant une protéine de 46 kDa homologue à p58.

L'analyse de l'expression de Cdk11 chez *S. pombe* a révélé qu'elle n'était pas régulée durant le cycle cellulaire. Cdk11 est présente dans le noyau et forme un complexe soluble, *in vivo*, avec l'homologue de la cycline L chez *S. pombe* (Plh1). La purification de Cdk11-Plh1 par « Tandem Affinity Purification » (TAP), couplée à la spectrométrie de masse, a révélé d'autres partenaires potentiels dont deux RNA hélicases et un facteur de transcription.

Sur base de l'appartenance de Cdk11 à la famille des Cdks « transcriptionnelles », nous avons testé son activité kinase pour le substrat GST-CTD *in vitro* et l'effet de l'absence de *cdk11* sur le niveau de phosphorylation du CTD *in vivo*. Dans les deux cas, ces expériences mettent en doute que la phosphorylation du CTD constitue le rôle biologique de Cdk11-Plh1, mais la localisation sur la région 3' du locus *act1*, montrée par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), supporte toutefois une connexion avec la transcription.

# Table des matières

Liste des abréviations	3
<b>Introduction</b>	<b>4</b>
1 La transcription	4
1.1 Vue générale	4
1.2 Le CTD de l'ARN polymérase II	5
2 Les Cdks	8
2.1 Vue générale	8
2.2 Les Cdks « transcriptionnelles »	8
2.2.1 Cdk7	8
2.2.2 Cdk8	9
2.2.3 Cdk9	9
3 La kinase Cdk11	11
3.1 Cdk11 chez les eucaryotes supérieurs	12
3.1.1 Cdk11 <sup>p110</sup>	12
3.1.2 Cdk11 <sup>p58</sup>	13
Objectif du mémoire	14
<b>Résultats</b>	<b>16</b>
1 Analyse des séquences orthologues de Cdk11	16
2 Expression et localisation de Cdk11	19
2.1 Expression de Cdk11 durant le cycle cellulaire	19
2.2 Localisation de Cdk11-GFP	21
3 Recherche des partenaires de Cdk11	22
3.1 Identification de la Cycline L chez <i>S. pombe</i>	22
3.1.1 Alignement de séquences	22
3.1.2 Coimmunoprécipitation de Plh1-TAP-Cdk11-myc	24
3.2 Tandem Affinity Purification et identification de partenaires	25
3.2.1 Principe de la purification TAP	25
3.2.2 Purification Cdk11-TAP	26
3.2.3 Vérification de l'interaction potentielle Cdk11-Spt5	27
3.2.4 Purification Plh1-TAP	28
4 Etude de l'activité kinase de Cdk11-Plh1	30
4.1 Test d'activité <i>in vitro</i>	30
4.2 Effet de l'absence de Cdk11 sur le degré de phosphorylation du CTD <i>in vivo</i> .	32
5 Localisation de Cdk11 sur la chromatine	34
<b>Discussion, conclusions générales et perspectives</b>	<b>35</b>
1 Discussion et Conclusions générales	35
2 Perspectives	38

<b>Matériel</b>	<b>39</b>
1 Souches utilisées	39
2 Plasmides utilisés	39
3 Tampons et solutions utilisés	39
<b>Méthode</b>	<b>41</b>
1 Méthodes relatives à l'ADN et génétique	41
1.1 PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	41
1.1.1 PCR « gene targeting »	41
1.1.2 PCR sur colonies	42
1.1.3 Electrophorèse sur gel d'agarose	42
1.2 Purification des produits PCR	43
1.3 Transformation de levures	43
1.4 Croisement	43
2 Méthodes relatives aux protéines	44
2.1 Extraction des protéines totales	44
2.2 Immunoprécipitation et coimmunoprécipitation	44
2.3 Electrophorèse SDS-PAGE et Western Blot	46
2.4 Test d'activité kinase	47
2.5 Purification TAP	48
Bibliographie	50

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CAK	Cdk-activating kinase
CBP	Calmodulin binding peptide
cdc	Cell division cycle
Cdk	Cyclin dependent kinase
CTD	Domaine C-terminal de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II
DAPI	Diamidino-4',6-phénylindol-2dichlorhydrate
dNTP	Désoxyribonucléoside 5' tri-phosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide Éthylènediamine tétraacétique
GFP	Green fluorescent protein
His	Histidine
IgG	Immunoglobuline G
IP	Immunoprécipitation
Kan	Kanamycine
Leu	Leucine
LiAC	Acétate de lithium
MPF	Maturation promoting factor
Nat	Nourseothricine
NMR	Non-sense mediated mRNA decay
ORF	Open reading frame
PAP	Peroxidase anti peroxidase
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Preinitiation complex
Pol II	ARN polymérase II
RNAi	RNA interférent
rpm	Rotation par minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Ser	Sérine
TAP	Tandem affinity purification
TE	Tris EDTA
Ura	Uracile

# Introduction

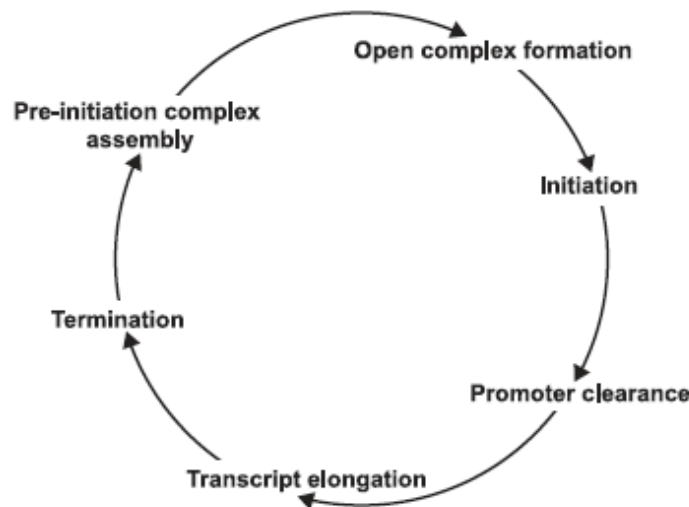
## 1 La transcription

### 1.1 Vue générale

L'expression du matériel génétique, des gènes aux protéines, requière différentes étapes, incluant la transcription ainsi que des mécanismes cotranscriptionnels comme le coiffage de l'ARNm, l'épissage des introns et la polyadénylation qui génèrent un ARN messager qui sera traduit en protéine.

Il existe un grand nombre de processus cellulaires qui contrôlent l'expression génétique, et beaucoup d'entre eux opèrent au niveau de la transcription. Chez les eucaryotes, la transcription des phases ouvertes de lecture (ORF) codant pour des protéines est réalisée par l'ARN polymérase II (Pol II). L'holoenzyme Pol II est constituée de douze sous-unités (Rpb 1 à Rpb12) fortement conservées chez les eucaryotes (Ishihama et al., 1998).

Pour comprendre le processus transcriptionnel, on peut le diviser en différentes phases qui forment le cycle de la transcription. Ces phases sont la formation du complexe de préinitiation (PIC), l'initiation, le détachement du promoteur, l'élongation et la terminaison (Svejstrup, 2004) (Figure 1).



**Figure 1.** Le cycle de la transcription (Svejstrup, 2004)

Le cycle de la transcription débute avec la formation du PIC au niveau de la région promotrice. Celui-ci comprend au minimum Pol II, six facteurs de transcription généraux (désignés TFIIA, -B, -D, -E, -F et -H), ainsi que plusieurs cofacteurs (Orphanides et al., 1996).

L'initiation de la transcription a lieu dans une série d'étapes ordonnées. Pour commencer, le facteur général de transcription TFIID reconnaît les éléments du promoteur, puis le complexe

TFIID est reconnu par les complexes TFIIB et TFIIA. A cette étape, TFIIF et le complexe Pol II sont recrutés. Et enfin, les complexes TFIIE et TFIIH se lient pour former le complexe de préinitiation (Figure 2) (Orphanides et al., 1996).

La formation d'un complexe entre Pol II et l'ADN ouvert est nécessaire pour l'initiation. Le désappariement de l'ADN est un processus ATP-dépendant et nécessite l'action de facteurs de transcription (Kim et al., 2000). Une fois ce complexe établi, l'initiation de la transcription démarre avec la formation du premier lien phosphodiester.

Avant que la phase d'élongation de la transcription commence, une phase intermédiaire, appelée phase de « promoter clearance » (détachement du promoteur), a lieu. Durant cette étape, le PIC est partiellement désassemblé. Une partie des facteurs de transcription restent liés au promoteur, pouvant ainsi servir pour le prochain complexe de préinitiation (Yudkovsky et al., 2000). Après une pause qui permet notamment le recrutement de facteurs assurant la maturation du messager, l'élongation peut commencer (Bentley, 2002).

La dernière étape de la transcription est la terminaison. L'ARNm est clivé, polyadénylé et exporté dans le cytoplasme où il sera traduit (Proudfoot et al., 2002). La polymérase, quant à elle, est recyclée pour entrer dans un nouveau cycle.

## 1.2 Le CTD de l'ARN polymérase II

La plus grosse sous-unité (Rpb1) de l'ARN polymérase II possède un domaine C-terminal (CTD), de structure très inhabituelle, qui joue un rôle primordial dans la transcription. Il constitue une « plateforme » de recrutement de différents facteurs régulant la transcription, ou impliqués dans la maturation de l'ARNm.

Le CTD est constitué d'un grand nombre de répétitions de la séquence consensus tyrosine-sérine-proline-thréonine-sérine-proline-sérine (YSPTSPS). Ce motif est très conservé chez les eucaryotes mais le nombre de répétitions varie selon les espèces (29 chez *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) à 52 chez les mammifères) (Meinhart et al., 2005), les déviations du consensus étant également plus ou moins marquées selon les espèces (Figure 3).

1 YSPTSPA	19 YSPTSPS	37 YSPTSPE
2 YEPSPGG	20 YSPTSPS	38 YSPTSPK
3 YTPQSPS	21 YSPTSPS	39 YSPTSPK
4 YSPTSPS	22 YSPTSPN	40 YSPTSPK
5 YSPTSPS	23 YSPTSPN	41 YSPTSPT
6 YSPTSPN	24 YSPTSPS	42 YSPTTPK
7 YSPTSPS	25 YSPTSPS	43 YSPTSPT
8 YSPTSPS	26 YSPTSPN	44 YSPTSPV
9 YSPTSPS	27 YSPTSPN	45 YTPSPK
10 YSPTSPS	28 YSPTSPS	46 YSPTSPT
11 YSPTSPS	29 YSPTSPS	47 YSPTSPK
12 YSPTSPS	30 YSPTSPS	48 YSPTSPT
13 YSPTSPS	31 YSPSSPR	49 YSPTSPKGST
14 YSPTSPS	32 YTPQSPT	50 YSPTSPG
15 YSPTSPS	33 YTPSSPS	51 YSPTSPT
16 YSPTSPS	34 YSPSSPS	52 YSLTSPAISPDDSDDEEN
17 YSPTSPS	35 YSPTSPK	
18 YSPTSPS	36 YTPSPS	

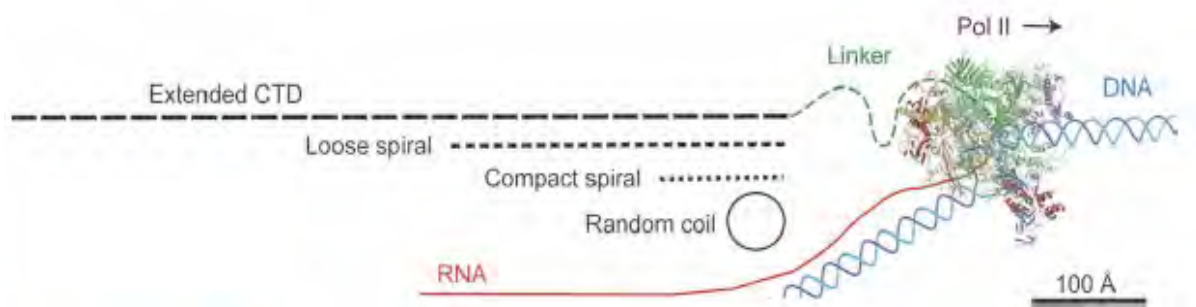
**Consensus :**  
Y<sub>1</sub> S<sub>2</sub> P<sub>3</sub> T<sub>4</sub> S<sub>5</sub> P<sub>6</sub> S<sub>7</sub>

**Figure 3.** Séquence du CTD humain (Palancade and Bensaude, 2003).



Le CTD forme une « queue » branchée à proximité du site catalytique de la Pol II et relié à Rpb1 de manière flexible par un linker d'environ 80 acides aminés. Bien qu'il puisse adopter différentes conformations, le CTD montre une certaine tendance à former des « $\beta$ -turns» (Meinhart et al., 2005).

Dans une conformation étendue, le CTD, chez la levure, peut atteindre 650 Å. On peut le retrouver dans une conformation plus compacte, d'environ 100 Å (Meredith et al., 1996). Cependant, il existe plusieurs modèles représentant la forme compacte du CTD, notamment la forme « random coil » (Cramer et al., 2001), la forme « loose spiral » et la forme « compact spiral » (Cagas and Corden, 1995). La présence de cinq acides aminés phosphorylables dans le consensus permet une hyperphosphorylation qui résulte en une structure plus étendue (Laybourn and Dahmus, 1989) que les formes compactes à cause de la répulsion des charges négatives des phosphates (Figure 4).

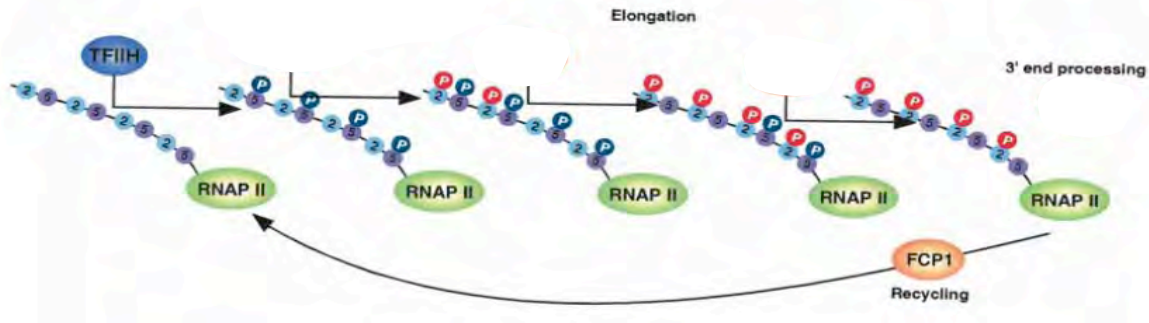


**Figure 4.** ARN pol II et représentation des différentes formes du CTD (modifié (Meinhart et al., 2005)).

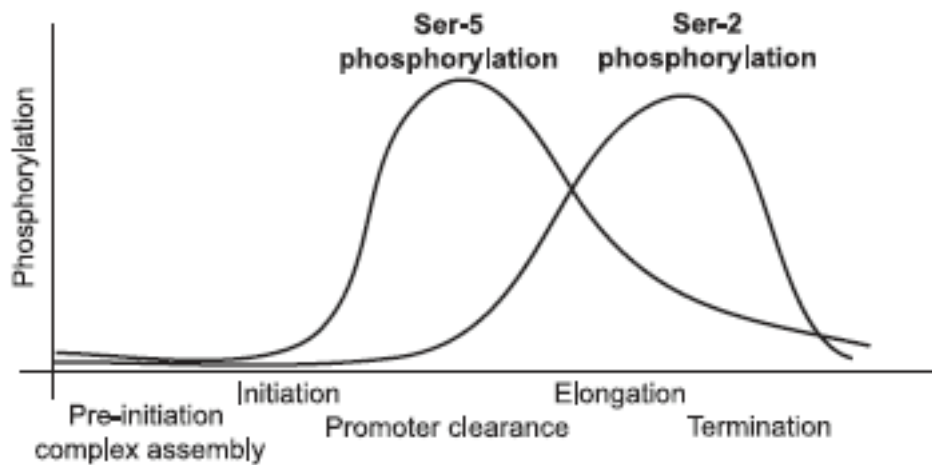
Dans un extrait cellulaire brut, Pol II apparaît sous deux formes: la forme hyperphosphorylée ( $II_0$ ) et la forme hypophosphorylée ( $II_a$ ), qui ont été mises en évidence grâce à leur différence de mobilité électrophorétique marquée (Schwartz and Roeder, 1975). Lors de son recrutement au promoteur, Pol II se trouve sous la forme  $II_a$  alors que durant l'élongation, la forme  $II_0$  prédomine (Laybourn and Dahmus, 1989).

Parmi les cinq résidus phosphorylables, les sérines 2 et 5 sont les principaux sites de phosphorylation du CTD (Zhang and Corden, 1991). Il a été très tôt suggéré qu'un code puisse exister, résultant de la phosphorylation différentielle des sérines 2 et 5, et de la phosphorylation différentielle des répétitions le long du CTD. Le sens biologique de ce code étant de moduler l'affinité du CTD pour différents facteurs qui régulent la transcription.

Le CTD présente quatre états principaux de phosphorylation durant le cycle de la transcription. Comme nous l'avons dit, Pol II est hypophosphorylée lors du recrutement à la région promotrice. Lors de l'initiation, et jusqu'au début de l'élongation, le CTD est phosphorylé sur les sérines 5. L'étape de phosphorylation des sérines 2 est typiquement l'élongation. Pendant son déplacement sur les phases ouvertes de lecture, le CTD de Pol II contient donc des répétitions phosphorylées sur les sérines 2 et 5. A proximité de la région 3' du gène, une déphosphorylation de la sérine 5 par la phosphatase Fcp1 est observée et en conséquence, c'est la sérine 2 qui est le résidu majoritairement phosphorylé (Komarnitsky et al., 2000; Svejstrup, 2004) (Figure 5 et 6).



**Figure 5.** Etat de phosphorylation du CTD de Rpb1 durant les différentes étapes de la transcription (modifié de (Sims et al., 2004)).



**Figure 6.** Etat de phosphorylation du CTD de Rpb1 durant le cycle de la transcription (Svejstrup, 2004).

L'identification des Cdks (Cyclin Dependent Kinases) comme acteurs de la phosphorylation du CTD a joué un rôle essentiel dans la compréhension du rôle du CTD et de ses modifications dans le cycle de la transcription.

## 2 Les Cdk

### 2.1 Vue générale

Les kinases dépendantes de cyclines constituent une large famille de sérines/thréonines kinases qui requièrent l'association avec une cycline pour être actives (Pines, 1995). De plus, la majorité des Cdk doivent être phosphorylées sur un résidu situé entre les deux domaines de l'enzyme sur le « T-loop », par une Cdk-activating kinase (CAK), pour être pleinement active (Morgan, 1997). Cette phosphorylation stabilise l'interaction Cycline-Cdk et induit la liaison au substrat.

Les Cdk ont d'abord été identifiées comme régulateurs essentiels de la progression du cycle cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, il existe cinq Cdk principales impliquées dans le contrôle de deux transitions du cycle : l'initiation de la réplication et l'entrée en mitose (van den Heuvel and Harlow, 1993).

Cdk2 interagit avec la cycline E au début de la phase S pour induire la synthèse de l'ADN et par la suite, interagit avec la cycline A durant la phase S. La mitose est initiée par la liaison de Cdc2 (Cdk1) avec la cycline B pour former le facteur MPF (M-phase-promoting factor). Cdk4 et Cdk6, en association avec les cyclines D, participent à l'induction de la prolifération cellulaire. Cdk4, Cdk6 et Cdk3 régulent la progression de la phase G1 (van den Heuvel and Harlow, 1993). Chez les levures *S. pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), la seule Cdc2 (Cdk1) régule les deux transitions en association avec différentes cyclines (Morgan, 1997).

Les génomes eucaryotes renferment tous des séquences codant pour plusieurs autres Cdk sans que celles-ci puissent être directement liées à la régulation du cycle cellulaire. Leur rôle dans la phosphorylation du CTD a permis d'éclaircir cette énigme et vaut à cette sous-famille le nom de « Cdk transcriptionnelles » (Dahmus, 1994).

### 2.2 Les Cdk « transcriptionnelles »

Une combinaison d'évidences *in vitro* et *in vivo* impliquent trois Cdk (Cdk7, Cdk8 et Cdk9) dans le contrôle de la machinerie Pol II. Ces Cdk qui phosphorylent le CTD *in vitro* sont donc appelées les CTD kinases.

#### 2.2.1 Cdk7

Le complexe Cdk7/Cycline H/Mat1 est souvent présenté comme le pont entre les Cdk qui contrôlent le cycle cellulaire et les Cdk transcriptionnelles (Fisher et al., 1995). En effet, ce complexe trimérique est multifonctionnel : il est nécessaire pour l'activation de Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6 en fonctionnant comme CAK (voir ci-dessus), mais fait partie intégrale du facteur général de transcription TFIIF (Fisher and Morgan, 1996) qui phosphoryle le CTD lors de l'initiation de la transcription.

TFIIH joue un rôle important dans la transcription. Premièrement, il induit l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur, de manière ATP-dépendante, par l'activité 3'-5' hélicase de la sous-unité XBP (Wang et al., 1992). Ensuite, il phosphoryle les résidus sérine 5 du CTD, grâce à l'activité kinase de Cdk7 pour permettre le « promoter clearance » (Spangler et al., 2001).

Chez *S. pombe*, les protéines orthologues de Cdk7, la cycline H et Mat1 sont respectivement Mcs6, Mcs2 et Pmh1, qui se comportent de façon équivalent à Cdk7-CyH-Mat1 au sein du facteur général de transcription TFIIH (Buck et al., 1995) (Damagnez et al., 1995).

### 2.2.2 Cdk8

Dans les années 90, des études biochimiques et génétiques chez *S. cerevisiae*, ont amené à la découverte du complexe « mediator », qui joue un rôle d'adaptateur entre les facteurs de transcription liés aux éléments régulateurs, Pol II et les facteurs généraux de transcription. Ce complexe comprend jusqu'à 25 sous-unités, dont les protéines Srb (Suppressor of Rna polymerase B) et les protéines MED (Roeder, 2005).

A l'inverse des facteurs de transcription généraux, le complexe « mediator » est incapable de lier des séquences spécifiques d'ADN et interagit physiquement avec Pol II. Il interagit directement avec la forme non phosphorylée du CTD pour former une holoenzyme (Kim et al., 1994). Une fois le CTD phosphorylé, le complexe « mediator » se dissocie de Pol II (Max et al., 2007).

Les mécanismes selon lesquels le complexe « mediator » influence la transcription ne sont pas encore complètement déterminés. Cependant, il a été démontré que ce complexe pouvait avoir un rôle activateur sur la transcription (Cantin et al., 2003; Johnson and Carey, 2003; Wu et al., 2003). Il servirait de « pont » entre les protéines régulatrices et la machinerie basale de Pol II.

Le complexe « mediator » prendrait également part à la répression de la transcription. Cdk8 avec la cycline C, s'associe aux sous-unités MED12 et MED13 pour former un module du mediator (Kornberg, 2005). Le couple Cdk8/cycline serait impliqué dans la répression de la transcription. Selon le modèle de Hengartner, Cdk8 phosphoryle le CTD de la polymérase soluble, empêchant son recrutement au promoteur et la formation du complexe d'initiation (Hengartner et al., 1998). Ce modèle, comme la capacité de Cdk8 de fonctionner comme CTD kinase *in vivo*, sont sujets à controverse.

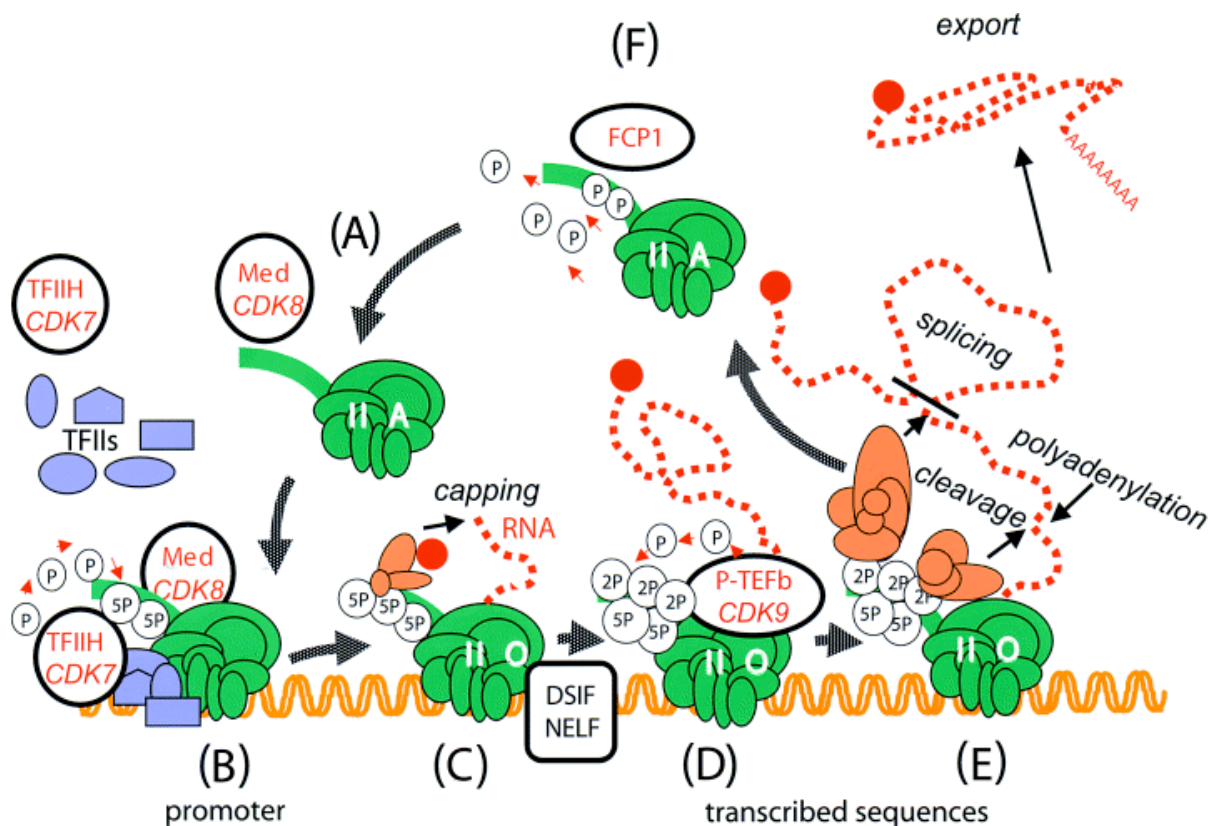
### 2.2.3 Cdk9

L'élongation de la transcription est un processus hautement régulé par le facteur N-TEF (Negative transcription elongation factors), qui inclut les complexes DSIF (5,6-dichloro-1 $\beta$ -d-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor) et NELF (Negative elongation factor) (Hartzog et al., 1998). Ces complexes arrêtent Pol II juste après l'initiation, la laissant dans un état de pause, requis pour recruter les facteurs de processing et notamment les enzymes de coiffage du messager. Le facteur P-TEFb (positive transcription elongation factor) est indispensable pour annuler l'état de pause et permettre une élongation productive (Price,

2000). Il agit directement sur le complexe DSIF, composé des protéines Spt4 et Spt5, en phosphorylant Spt5 (Wada et al., 1998). P-TEFb permet également de déplacer NELF (Yamaguchi et al., 1999).

Des études biochimiques ont révélé que P-TEFb était constitué de Cdk9 associé à une cycline de type T (Peng et al., 1998). En plus de Spt5, Cdk9 phosphoryle la sérine 2 du CTD pour optimiser l'élongation et permettre le recrutement de facteurs requis pour l'épissage et la polyadénylation (Kim and Sharp, 2001).

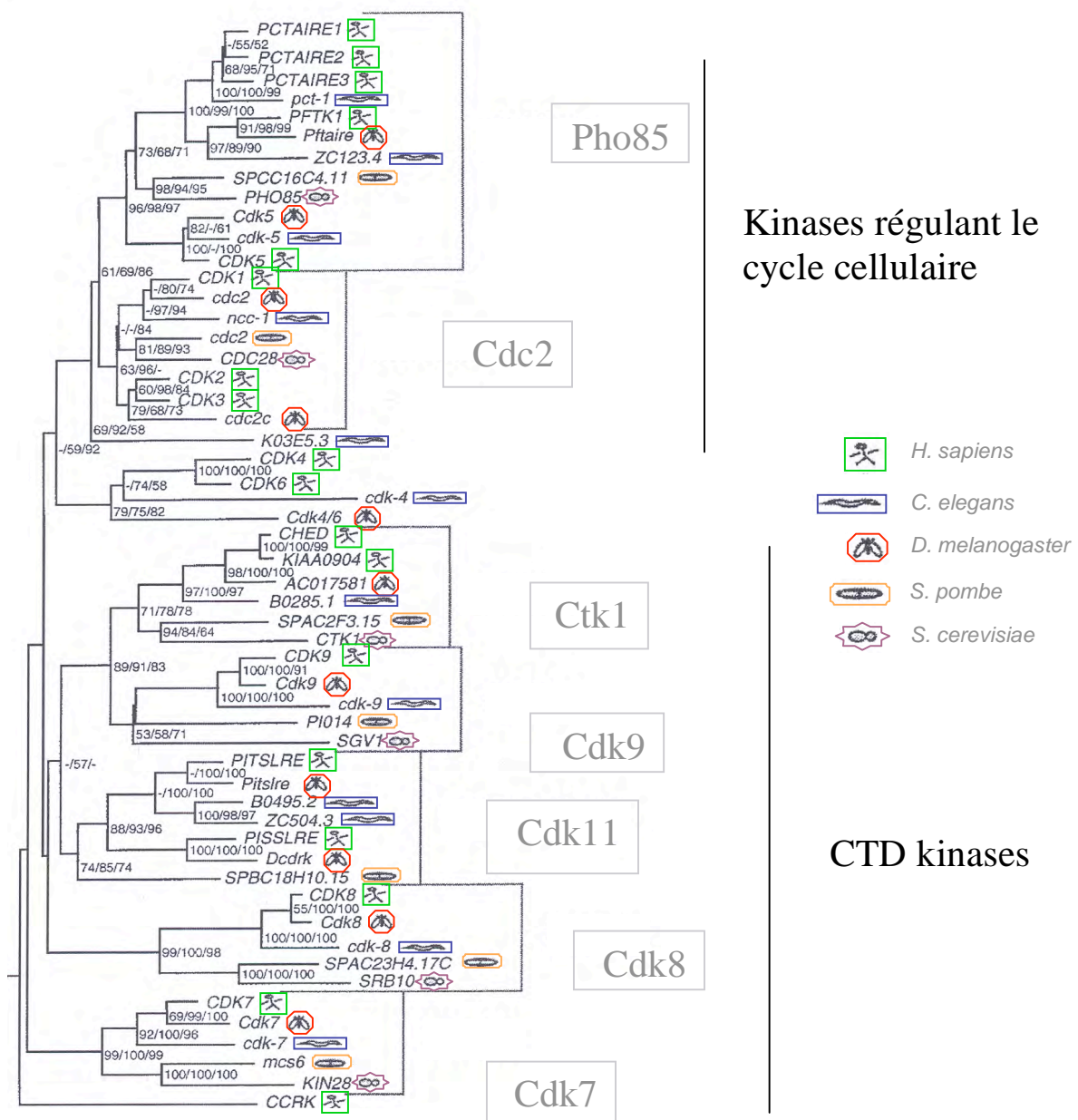
La figure 7 présente un résumé des actions des trois CTD kinases décrites ci-dessus dans la régulation de la transcription. La polymérase soluble n'est pas phosphorylée (forme II<sub>a</sub>) et interagit avec le complexe mediator pour former une holoenzyme (la phosphorylation du CTD par Cdk8 pouvant empêcher la formation du PIC sur le promoteur). Lors de la phase d'initiation, le CTD est phosphorylé sur la sérine 5 par Cdk7 et la transcription commence. Le CTD phosphorylé recrute les enzymes de coiffage et le transcrit naissant est coiffé à son extrémité 5'. Ensuite, l'élongation de la transcription peut démarrer par la phosphorylation de la sérine 2 du CTD et l'inactivation des facteurs DSIF et NELF par Cdk9. Les enzymes de maturation (épissage, polyadénylation) de l'ARNm sont recrutés par le CTD phosphorylé. Cette étape signale la terminaison de la transcription et la polymérase est libérée pour être recyclée. Le message est exporté vers le cytoplasme (Palancade and Bensaude, 2003).



**Figure 7.** La phosphorylation du CTD et le cycle de transcription (Palancade and Bensaude, 2003).

### 3 La kinase Cdk11

Le séquençage de nombreux génomes depuis une dizaine d'années a permis une comparaison exhaustive de la famille des Cdks chez des espèces éloignées. Une étude bioinformatique réalisée par J. Liu et T. Kipreos a établi un arbre phylogénétique de cette famille qui confirme l'existence de deux sous-familles : les Cdks régulant directement le cycle cellulaire (par exemple le groupe Cdc2, Figure 8) et les Cdks transcriptionnelles (regroupées dans le bas du tableau de la Figure 8) (Liu and Kipreos, 2000). Nous avons mentionné les groupes Cdk7, Cdk8 et Cdk9 qui sont clairement visibles dans l'arbre phylogénétique. Le groupe Ctk1 est très apparenté au groupe Cdk9 et les deux auraient des fonctions redondantes.



**Figure 8.** Phylogénie par Neighbor-joining de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster*, *C. elegans* et *H. sapiens*. (modifié de (Liu and Kipreos, 2000)). Un code couleur représente les différentes espèces étudiées.

Un dernier groupe est parfois dénommé PITSLRE pour rappeler la suite d'acides aminés qu'on retrouve typiquement dans la poche de liaison à l'ATP des kinases qui le constituent. Plus communément, on parle du groupe Cdk11 (Figure 8). La caractéristique de ce groupe est la présence d'au moins un orthologue chez tous les eucaryotes étudiés avec l'exception notable de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.1 Cdk11 chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, les gènes encodant la protéine Cdk11 expriment une protéine de 110 kDa. Une isoforme plus petite de 58 kDa correspondant à la partie C-terminale est également exprimée pendant la mitose. Elle résulte de la présence d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans l'ARN messager (Cornelis et al., 2000).

Une troisième forme de 46 kDa produite pendant l'apoptose résulte du clivage de p110 et p58 par des caspases (Lahti et al., 1995a) (Lahti et al., 1995b). Un seul gène est présent chez la souris (*cdc2L1*) mais deux gènes codant pour des protéines presque identiques sont retrouvés dans le génome humain (*cdc2L1* et *cdc2L2*) (Gururajan et al., 1998). Un « knock out » a été réalisé chez la souris et entraîne, à l'état homozygote, une létalité très précoce qui résulte de l'apoptose au stade blastocyste (Li et al., 2004). Le gène n'est pas essentiel chez la levure *S. pombe*.

#### 3.1.1 Cdk11<sup>p110</sup>

Les fonctions exactes de Cdk11<sup>p110</sup> sont encore inconnues. Cdk11<sup>p110</sup> est exprimée de manière ubiquitaire et constante durant le cycle cellulaire (Xiang et al., 1994). Plusieurs études d'ambition modeste ont lié Cdk11<sup>p110</sup> à la régulation de la transcription et/ou à l'épissage de l'ARNm sans qu'une évidence forte n'ait été fournie.

Des interactions entre Cdk11<sup>p110</sup> et plusieurs complexes comprenant Pol II, les facteurs d'élongation de la transcription ELL2, TFIIF, TFIIS et FACT mais également RNPS1, un activateur de l'épissage de l'ARNm, ont été rapportées. Ces données ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle Cdk11<sup>p110</sup> servirait de « pont » entre les protéines régulant l'élongation de la transcription et les complexes impliqués dans la maturation de l'ARNm (Trembley et al., 2002).

Un travail plus complet montre que Cdk11<sup>p110</sup> peut s'associer à un complexe comprenant entre autre 9G8, un facteur essentiel d'épissage. 9G8 interagit avec Cdk11<sup>p110</sup> *in vivo* et est phosphorylée par Cdk11<sup>p110</sup> *in vivo* et *in vitro*. Aussi l'immunodépletion spécifique de Cdk11<sup>p110</sup> résulte en une perte d'activité d'épissage *in vitro* (Hu et al., 2003).

En 2002, il a été montré que les cyclines de type L, non caractérisées jusque là, sont des partenaires de Cdk11. Ces protéines possèdent une « cyclin box » et un domaine RS (répétitions des acides aminés arginine-sérine) typique des protéines d'épissage, ce qui renforce le lien entre Cdk11 et la maturation des ARNm et plus spécifiquement l'épissage. L'absence de Cdk11 chez la levure *S. cerevisiae* qui est très pauvre en intron est également à rappeler dans ce contexte (Dickinson et al., 2002).



Une étude rapporte une activité CTD kinase pour Cdk11<sup>p110</sup>. Cependant, il a été montré que c'est la casein kinase (CK2) co-purifiée qui exerce l'activité kinase sur le CTD (Sachs and Vaillancourt, 2003) (Trembley et al., 2003). L'activité kinase de Cdk11 pour le CTD reste donc incertaine.

### 3.1.2 Cdk11<sup>p58</sup>

La petite isoforme de Cdk11, p58, est exprimée spécifiquement durant la transition entre la phase G2 et la mitose (Cornelis et al., 2000). Comme Cdk11<sup>p110</sup>, les fonctions de Cdk11<sup>p58</sup>, supposées en mitose à cause de son profil d'expression, sont à l'heure actuelle encore inconnues.

La cycline D3 interagit de manière spécifique avec Cdk11<sup>p58</sup> durant la transition G2/M, alors que les autres types de cyclines D en sont incapables. De même que la cycline D3 est incapable d'interagir avec p110 (Zhang et al., 2002). Cdk11<sup>p58</sup> interagit également avec HBO1 (Histone acetyltransferase binding to QRC1) et induit son activité histone acétyltransférase (Zong et al., 2005).

Deux études récentes, nettement plus complètes, indiquent que Cdk11<sup>p58</sup> est directement impliquée dans la maturation des centrosomes et la formation d'un fuseau bipolaire en stabilisant les microtubules, une fonction spécifique de la forme p58 et en accord avec son profil d'expression (Petretti et al., 2006) (Yokoyama et al., 2008).

Comme on le voit, il émerge de toutes les études réalisées sur Cdk11 depuis une dizaine d'années une vision assez confuse de son ou ses rôles biologiques. Nous retiendrons une série d'évidences liant Cdk11 à la transcription et spécifiquement à la maturation des messagers, ainsi qu'un rôle mitotique probablement complètement différent et qui toucherait à la stabilisation du fuseau.

La présence d'un orthologue chez la levure *S. pombe* permettant une approche génétique et biochimique nous amène au seuil de notre travail.



## Objectif du mémoire

Dans la sous-famille des Cdks transcriptionnelles, le rôle de Cdk11 reste obscure. Le gène Cdk11 est présent chez tous les eucaryotes étudiés à part la levure *S. cerevisiae* et chez les eucaryotes supérieurs, la protéine est détectée sous trois formes de taille différente exprimées à partir du même ARN messager.

L'objectif de ce mémoire est de caractériser l'orthologue de Cdk11 chez la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe*.

Une première partie descriptive vise à caractériser le profil d'expression et la localisation de Cdk11 chez *S. pombe*, ainsi qu'à confirmer l'existence d'un complexe Cdk11-Cycline L apparenté à celui retrouvé chez les eucaryotes supérieurs.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si Cdk11 appartenait à un complexe plus large qui pourrait nous éclairer sur son rôle biologique en réalisant une purification de la protéine suivi de l'identification de ses partenaires par spectrométrie de masse.

Enfin, l'appartenance de Cdk11 à la famille des CTD kinases nous a conduit à tester son activité *in vitro* et *in vivo* sur le domaine C-terminale de l'ARN Polymérase II et son association à la chromatine.

### *Note préliminaire*

Le point de divergence entre les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* est estimé à un milliard d'années, ce qui explique les différences morphologiques et physiologiques importantes entre ces deux micro-organismes. Pour le biologiste, ceci constitue une occasion de pouvoir discerner les principes fondamentaux de fonctionnement de la cellule eucaryote des éléments plus spécifiques.

Chez les deux organismes, l'approche génétique est aisée du fait de la reproduction sexuée et de la possibilité de croissance végétative de l'état diploïde comme de l'état haploïde. La levure *S. pombe* est surtout reconnue pour avoir permis, à Paul Nurse, la découverte de la première Cdk en 1976 et la dissection des mécanismes qui régulent la progression dans le cycle cellulaire dans des travaux, qui ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel en 2001.

Depuis quelques années, elle est revenue au premier plan pour l'étude des acteurs de l'interférence par ARN (RNAi) et la découverte de leurs rôles dans la structuration de la chromatine, un pathway absent chez *S. cerevisiae*.

Pour les questions relatives à la chromatine et à l'expression génétique, *S. pombe*, est d'une manière générale, plus proche des eucaryotes supérieurs que *S. cerevisiae*. Une caractéristique non démentie lors de ce travail puisque la kinase Cdk11 est absente chez *S. cerevisiae*.

La première étape de notre travail a consisté à identifier l'ORF encodant Cdk11 chez *S. pombe*. Une phase ouverte de lecture de 1197 paires de base interrompue par un intron de 58 paires de base est présente sur le chromosome 2. Elle code pour une protéine de 46,1 kDA.

# Résultats

## 1 Analyse des séquences orthologues de Cdk11

Chez les eucaryotes supérieurs, la protéine Cdk11 existe sous deux formes majoritaires de taille différente (Cdk11<sup>p110</sup> et Cdk11<sup>p58</sup>). La plus petite est exprimée spécifiquement durant la transition entre la phase G2 et la phase M du cycle cellulaire.

Chez *S. pombe*, le gène *cdk11* code pour une protéine dont la taille maximale est 46 kDa. Nous avons donc cherché à savoir si la protéine présente chez *S. pombe* est équivalente à la forme p58 des eucaryotes supérieurs.

Nous avons réalisé un alignement multiple par le programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Thompson et al., 1994) entre les orthologues de Cdk11 chez différentes espèces eucaryotes modèles incluant *Homo sapiens* (88 kDa), *Mus musculus* (91 kDa), *Danio rerio* (93 kDa), *Drosophila melanogaster* (110 kDa) et *Schizosaccharomyces pombe* (46 kDa).

La Figure 9 montre clairement que la protéine de *S. pombe* s'aligne avec la partie C-terminale des protéines Cdk11 des autres espèces. Par ailleurs, une recherche d'homologie sur le protéome prédit de *S. pombe* avec la partie N-terminale des autres orthologues de Cdk11 ne révèle pas de candidats potentiels, rendant peu probable la possibilité qu'un autre gène encode chez *S. pombe* l'équivalent de cette partie de la protéine.

Hs-Cdk11	DSKRDSLEEGE-----LRDHRMEITIRNSPYR---REDSMEDRGEEDDSL A-----I	85
Mm-Cdk11	DSKRDSLEEGE-----LRDHRMEITIRNSPYR---REDSMEDRGEEDDSL A-----I	85
Dr-Cdk11	ELKRDTPEEGE-----LRDHRMEITIRNSPYT---REDSTEDRGEEDESL A-----I	85
Dm-Cdk11	ERRRHKERDDVGG AALALERDHYRYSREEHYHHHQRRERSSNAAAAYAKHH LGHAYHYP	120
Sp-Cdk11	-----	
Hs-Cdk11	KPPQQMSR-----KEKVHHRKDEKRKEKRRHRSHSAEGG--	119
Mm-Cdk11	KPPQQMSR-----KEKAHHRKDEKRKEKRRHRSHSAEGG--	119
Dr-Cdk11	KPPQQMTR-----KDKNYHRKEEKRKDKRRRRSHSAEGAE-	120
Dm-Cdk11	QPPQQQQQPLPPAPSYAAHHYHHHQHLSGARAAPREYHSYPSGYHSGSRHG DYPMEEPTR	180
Sp-Cdk11	-----	
Hs-Cdk11	---KHARVK--EKEREHER---RKRH-REEQDKARREW ERQKRREMAREHSRRERDRLE	169
Mm-Cdk11	---KHARVK--EKEREHER---RKRH-REEQDKARREW ERQKRREMAREHSRRERDRLE	169
Dr-Cdk11	---KHPRTKDKEKERENER---RKRQ-WHEDNKARQDYERQKRRDQARAH SRRERDRLE	172
Dm-Cdk11	RSSKYAESKDAESLEQDLRSRL LKKRHNYVKDYETEENYEH RVERSDRREGGRKERERTV	240
Sp-Cdk11	-----MAGSKWETEETNQFAIENQKLEEEWRK	27
	: .:* . . : *.	
Hs-Cdk11	QLERKRERERKMREQ-----QKEQREQKERERRAEERRKEREARREVS AHHRTMR--EDY	222
Mm-Cdk11	QLERKRERERKLR EQ-----QKEQREQKERERRAEERRKEREARREVS AHHRTMR--EEY	222
Dr-Cdk11	QLERKRERDRKLR EQ-----QREQRELEERERRAKERRKDRDTRRDVPI SHHRVAPAEY	228
Dm-Cdk11	RSTHKQNRHDRVIELLD SPEQEHHHQHQKSHRSKWREEVEVIRRKVPEDLELLARREKL	300
Sp-Cdk11	KRRLEKKRKRKILEE-----EEKAEERN-----	50
	: :*: . : * . . . . *	

17

Hs-Cdk11	SAEDGLKHEYFRETPLPIDPSMFPTWPAKSEQ-----QRVKRGTSRPPEGGGLGYSQL	725
Mm-Cdk11	NAEDGLKHEYFRETPLPIDPSMFPTWPAKSEQ-----QRVKRGTSRPPEGGGLGYSQL	754
Dr-Cdk11	SADALKHEYFRESPLPIDPSMFPTWPAKSEQ-----QRVKRGTSRAPPEGGQDFSQ	770
Dm-Cdk11	SADAALKHGFFKELPLPIDPSMFPTWPAKSELG-----ARKAQASSPKPPSGGSQFKQL	894
Sp-Cdk11	SAKEALEHPYFYESPRPKDPKFFPTFPSKAKGESKEKNVFSFRSASPKKMADSLVHSLA	408
	. * . . * : * : * * * * * . : * * * : * : * * : . . . .	
Hs-Cdk11	GDDD-----	729
Mm-Cdk11	GDDD-----	758
Dr-Cdk11	GDDD-----	774
Dm-Cdk11	GRDEPIIVGPGNKLSSGIITGNKKSHGA-----	922
Sp-Cdk11	SSSQLEAFDSFEYAEELCTLGSEWIQEAGVLLNLTQNCVIVCLILFRRYCTLYPPRVPDL	468
	. . :	
Hs-Cdk11	-----	
Mm-Cdk11	-----	
Dr-Cdk11	-----	
Dm-Cdk11	-----	
Sp-Cdk11	DAIVMACVSIGSKTTETPASVQDICNVVVYLKERFKDTNFEARGFIAHDLYSEEMYSSRN	528
Hs-Cdk11	-----LKETGFHLTT-TNQGASAA	747
Mm-Cdk11	-----LKETGFHLTT-TNQGASAA	776
Dr-Cdk11	-----LKDTGFHLTT-ANKGASMA	792
Dm-Cdk11	-----GGSSASTGFVLNAGITQRQLAM	944
Sp-Cdk11	RLSNMELEVLRLNFDTHIVIPKLAIHYLQTLQLIDNKKLLQITWNFLNDASRTRLCVL	588
	* *	
Hs-Cdk11	GPGFSLKF-----	755
Mm-Cdk11	GPGFSLKF-----	784
Dr-Cdk11	GPGFSLKF-----	800
Dm-Cdk11	GPGFSLKF-----	952
Sp-Cdk11	YPPFSLACGCIAMAARVIGMKLPKDWRVFDTTKEEIDSLTSILENFYKTSIAIAHKTLYL	648
	* ***	
Hs-Cdk11	-----	
Mm-Cdk11	-----	
Dr-Cdk11	-----	
Dm-Cdk11	-----	
Sp-Cdk11	IFTEQVSA	656

**Figure 9.** Alignement multiple de séquences protéiques de Cdk11 réalisé par ClustalW (Hs : Homo sapiens, Mm : Mus musculus, Dr : Danio Rerio, Dm : Drosophila melanogaster, Sp : Schizosaccharomyces pombe). Le symbole « \* » signifie que les résidus sont identiques (conservés), le symbole « : » signifie qu'il y a eu substitution conservée et le symbole « . » signifie qu'il y a eu substitution semi-conservée. Les acides aminés en rouge représentent le domaine de liaison à l'ATP, caractéristique de cette famille de kinases.

L'alignement révèle en outre que les gènes orthologues de *cdk11* codent pour une protéine très conservée au cours de l'évolution.

## 2 Expression et localisation de Cdk11

### 2.1 Expression de Cdk11 durant le cycle cellulaire

Le fait que *S. pombe* possède uniquement la forme tronquée de Cdk11 permet de poser l'hypothèse que comme chez les eucaryotes supérieurs, celle-ci est régulée durant le cycle cellulaire. Nous avons donc mesuré le niveau d'expression de Cdk11 au cours du cycle cellulaire sur une culture cellulaire synchronisée à l'aide d'un mutant thermosensible. Cette méthode est utilisée pour bloquer le cycle cellulaire à un point défini et libérer ensuite les cellules synchronisées.

Le gène *cdc25* code pour une phosphatase, nécessaire à l'activation de la kinase Cdc2 lors de l'entrée des cellules en mitose (Borgne and Meijer, 1996). A 36°C, le mutant thermosensible (ts) *cdc25-22* est en conséquence bloqué au niveau de la transition entre la phase G2 et M du cycle cellulaire alors qu'à 25°C, le cycle cellulaire se déroule normalement.

Nous avons intégré, à l'aide du marqueur, *kanR*, le tag TAP (Tandem Affinity Purification) en aval du gène *cdk11* chez *S. pombe*. Cette méthode de « gene targetting » doit permettre l'expression d'une protéine de fusion Cdk11-TAP à partir du locus et du promoteur endogène (voir Matériel et Méthode). Après vérification, cette souche a été croisée avec la souche mutante *cdc25-22* et le double mutant (*cdk11-TAP cdc25-22*) a été sélectionné.

Une culture inoculée à 25°C a été placée à 36°C durant 3 heures. Ce délai qui correspond au temps de doublement de *S. pombe* dans ces conditions permet à toutes les cellules de rejoindre la transition G2/M où elles sont bloquées puisque Cdc25 est inactivée.

La culture est alors rapidement refroidie à 25°C pour permettre la réactivation de Cdc25 et une entrée synchrone en mitose. Nous avons prélevé un échantillon toutes les 20 minutes pendant 4 heures de manière à couvrir au moins un cycle cellulaire entier. Sur ces échantillons, les analyses suivantes ont été réalisées.

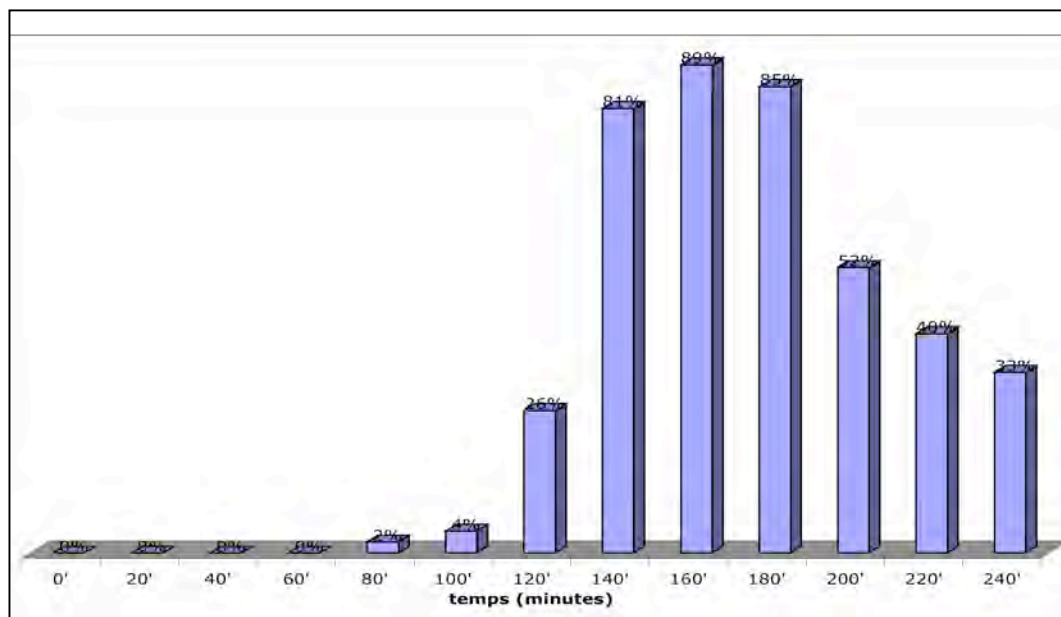
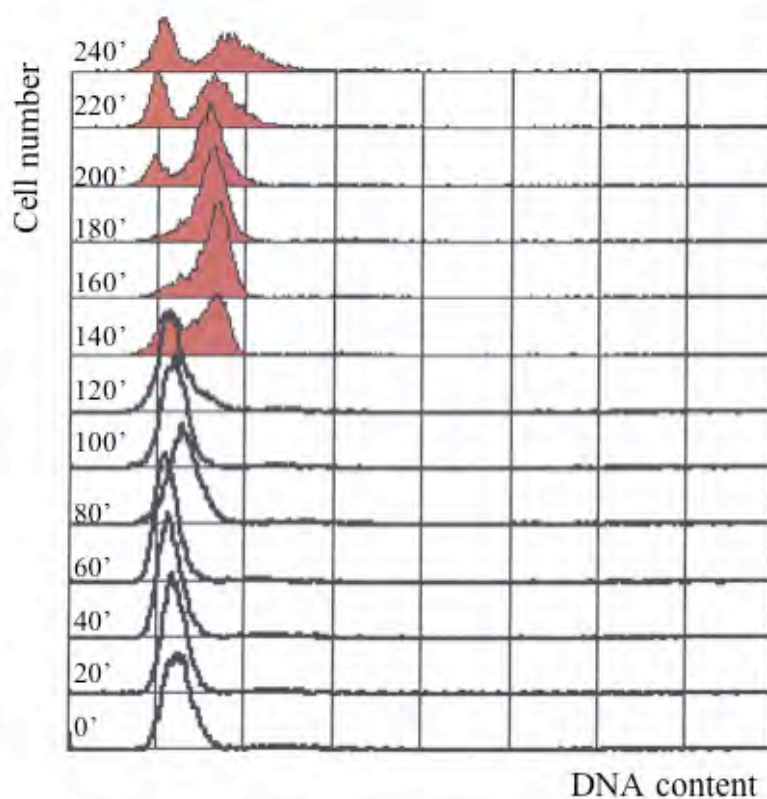
Pour confirmer que la culture cellulaire analysée a bien été synchronisée, nous avons effectué une analyse par FACS qui permet de suivre le contenu en ADN et son doublement lors de la réplication. Nous avons également coloré les cellules au colorant au calcofluor, qui permet de mettre en évidence le septum et donc de déterminer l'index de septation sur les 13 échantillons prélevés (Figure 10).

Selon les données obtenues par FACS, la réplication d'ADN débute à partir de 120 minutes et le contenu en ADN est réduit environ 80 minutes plus tard pour la majorité des cellules, témoignant de la synchronisation (Figure 10B).

Grâce à la coloration au calcofluor, l'index de septation, c'est-à-dire le pourcentage de cellules possédant un septum, a été calculé. L'index de septation augmente fortement à partir de 120 minutes et diminue dès 200 minutes attestant de la division et de la séparation des cellules filles (Figure 10A), et confirmant les résultats obtenus par FACS. La synchronisation obtenue permet de tester la présence de Cdk11 dans les différents échantillons au cours du cycle cellulaire.

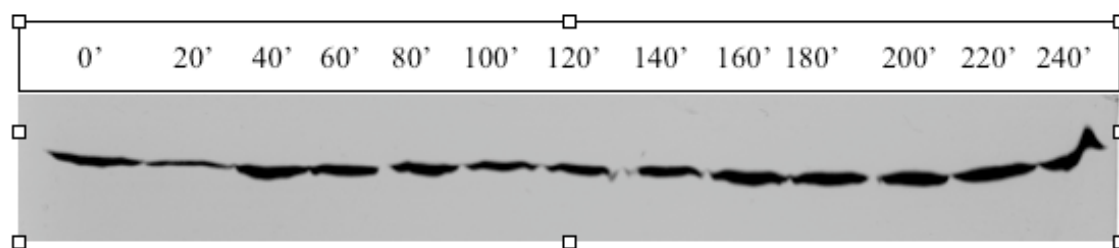
**A**

SI (%) 0% 0% 0% 0% 2% 4% 26% 81% 89% 85% 52% 40% 33%

**B**

**Figure 10.** Synchronisation de la culture cellulaire de la souche *cdk11-TAP/cdc25-22*. (**A** Index de septation (par la coloration calcofluor). Le graphique représente le pourcentage de cellules possédant un septum en fonction du temps. (**B**) Analyse par FACS sur les 13 échantillons prélevés.

Les protéines totales extraites des cellules de chaque échantillon ont été séparées par SDS-PAGE et détectées par Western Blot via l'anticorps peroxydase-anti-peroxydase (PAP) qui détecte le tag TAP (Figure 11).



**Figure 11.** Analyse du taux d'expression de *Cdk11* durant le cycle cellulaire. Les extraits des protéines totales des 13 échantillons prélevés ont été séparés par SDS-PAGE, et analysés par Western Blot en utilisant l'anticorps PAP.

Une bande à la taille attendue (66,6 kDa), correspondant à la fusion entre *Cdk11* et le tag TAP, est visible dans chaque piste, ce qui indique que le niveau d'expression de *Cdk11* est constant durant le cycle cellulaire. Nous pouvons donc conclure que, contrairement à ses orthologues présents chez les eucaryotes supérieurs, la présence de *Cdk11* chez *S. pombe* n'est pas régulée durant le cycle cellulaire.

## 2.2 Localisation de *Cdk11*-GFP

Comme décrit dans l'introduction, *Cdk11* est apparentée phylogénétiquement aux Cdk « transcriptionnelles », et pourrait jouer un rôle dans la phosphorylation du CTD de la grosse sous-unité de la polymérase II ou dans des processus apparentés à la transcription. La localisation cellulaire peut permettre de confirmer ou au contraire de mettre en doute des hypothèses générées par d'autres voies.

Pour localiser *Cdk11* chez *S. pombe*, nous avons créé une nouvelle souche exprimant *Cdk11* fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP) par « gene targetting ». Après coloration au DAPI (qui fixe l'ADN), nous avons observé les cellules au microscope à fluorescence avec les filtres adéquats (Figure 12).

Le DAPI met en évidence la masse d'ADN, en croissant de lune typique de *S. pombe*, qui résulte d'une coloration très faible du nucléole. Dans toutes les cellules observées, un signal similaire au DAPI est visible avec le filtre GFP. Ceci indiquant une localisation nucléaire et potentiellement chromatinienne de *Cdk11*-GFP qui n'apparaît pas dans une souche non taggée.

Par ailleurs, des points correspondant à une ou des structures inconnues sont aussi, mais pas systématiquement, visibles dans le cytoplasme. Nous concluons que *Cdk11* est en tous cas, mais peut-être pas exclusivement, une protéine nucléaire. Cette conclusion est en accord avec un rôle de *Cdk11* dans la transcription.



### 3 Recherche des partenaires de Cdk11

#### 3.1 Identification de la Cycline L chez *S. pombe*

##### 3.1.1 Alignement de séquences

Comme décrit dans l'introduction, Cdk11 doit s'associer à une cycline pour être active, et il existe des évidences indiquant que les cyclines de type L sont les activateurs de Cdk11. Nous avons donc cherché à identifier une cycline L chez *S. pombe*.

Un BLASTP (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/blast.jsp>) (Altschul et al., 1990), utilisant la cycline L1 humaine comme appât (les cyclines L1 et L2 sont très apparentées) sur le protéome prédit de *S. pombe*, met en évidence une séquence candidate. Les candidats suivants dans la liste ci-dessous correspondent aux cyclines associées à Cdk9, Ctk1 et Cdk8 comme attendu.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability P(N)
SPAC1296.05c cyclin L family cyclin Schizosaccharomyce...	315	1.2e-29
SPBC32F12.06 pch1 Schizosaccharomyces pombe...	295	2.1e-27
SPBC530.13 cyclin Ctk2 Schizosaccharomyces pombe chr 2...	194	1.4e-14
SPBC12D12.06 srb11 cyclin C, Srb mediator subunit Sr...	132	5.3e-08

L'ORF candidate de 777 paires de base est localisée sur le chromosome 1 et interrompue par un intron de 88 paires de base. Elle code pour une protéine de 29,3 kDa.

Nous avons réalisé un alignement multiple par ClustalW avec des séquences orthologues chez d'autres espèces (Figure 13).

Hs-CyL1	MASGPHST-----ATAAAAASSAAPSAGGSSSG-----TTTTTTTTTTGGILI	42
Mm-CyL1	MASGPHPTSTAAAAAAAAASASSAAPSAGGSSSG-----TTTTTTTTTTGGILI	48
Dr-CyL1	-----MSLGMLSP-----HLNTPPPNNQGILI	22
Ce-CyL1	MASFVEMRKLAIAKVQNMIRTIVKPKQNGNVEPKKEDEKFESTYKQNTQITPSSFG	60
Sp-Plh1	-----MA	2
	:	
Hs-CyL1	GDRLYSEVSLTIDHSLIPEE-----RLSPTPSMQDGLDLPSETDLRILGCELIQAAGILL	97
Mm-CyL1	GDRLYSEVSLTIDHSLIPEE-----RLSPTPSMQDGLDLPSETDLRILGCELIQAAGILL	103
Dr-CyL1	GDKVYSEVFLAIDNSIIPED-----RLSTTPSMLDGLDHETETDLRILGCERIQSAGILL	77
Ce-CyL1	KRPLYSKVDINCDKWLMTLDEESRLKIDNPPSLVDGLSKETESELRYLGCELIQQAAILL	120
Sp-Plh1	DSLVS-----LASSQLEAFDSFEYAEELCTLGSEWIEAGVLL	42
	::* : . . . : . : * * * . * * . : * *	
Hs-CyL1	RLPQVAMATGQVLFHRFFYSKSFVKHSFEIVAMACINLASKIEEAPRRIRDVINVFHHLR	157
Mm-CyL1	RLPQVAMATGQVLFHRFFYSKSFVKHSFEIVAMACINLASKIEEAPRRIRDVINVFHHLR	163
Dr-CyL1	RLPQVAMATGQVIFQRFYKSFVKHNFIEIVAMACVNLASKIEEAPRRVRDVINVFHHLK	137
Ce-CyL1	KLPQTAAATGQILFQRYYYQKSFVRYHFEHAVQACLLLASKIEEAPRRPREVYNVVFHRL	180
Sp-Plh1	NLTQNCVIVCLILFRYCTLYPPRPVLDIAVMACVSIKSTTETPASVQDICNVVYVYK	102
	. * . * . : * * * : . : . * * : * * * * : * * . *	

Hs-CyL1	QLR-----GKRTPSPLILDQNYINTKNQVIKAERRVLKELGFCVHVKHPHKII	205
Mm-CyL1	QLR-----GKRTPSPLILDQNYINTKNQVIKAERRVLKELGFCVHVKHPHKII	211
Dr-CyL1	Q GK-----GKKS-TPLILDQNYINTKNQVIKAERRILKELGFCVHVKHPHKII	184
Ce-CyL1	RLHRLQQSGHDINKETTRGMKPPAVDMNYINTKQHMINSEERRILATLGFVVHVKHPHRLI	240
Sp-Plh1	ERFKDTN-----FEARGFIAHDLYSEEMYSSRNRLSNMELEVLRLNFDTHIVIPHKLA	156
	. : . : : : : * . : * * . * : * : :	
Hs-CyL1	VMYLQVLECEERNQ-TLVQTAWNYMNDSLRTNVFVRFQPETIACACIYLAARALQIPLPTR	264
Mm-CyL1	VMYLQVLECEERNQ-TLVQTAWNYMNDSLRTNVFVRFQPETIACACIYLAARALQIPLPTR	270
Dr-CyL1	VMYLQVLECEKNQ-MLVQTAWNYMNDALRTSAFVRFEPEPETIACACIYLAARVLQIPLPSK	243
Ce-CyL1	VAYGHTLGITQSRPDILQRSMNYMNDGLRTDIFMRYKPETIACACIFLAARTVENPIALP	300
Sp-Plh1	IHYLQTLQLIDNK-KLLQITWNFLNDASRTRLCVLYPPFSLACGCIAMAAARVIGMKLP--	213
	: * : . * : : : * : * : : * : * : * : * : : :	
Hs-CyL1	P---HWFLFLFGTTEEEIQEICIETLRLYTR-KKPNYELLEKEVEKRRKVALQEAKLKAKGL	320
Mm-CyL1	P---HWFLFLFGTTEEEIQEICIETLRLYTR-KKPNYELLEKEVEKRRKVALQEAKLKAKGL	326
Dr-CyL1	P---HWFLFLFGATKEDIKEICINTMKLYSR-EKPHSEQLERQVEKRRIFLEEARKLARGQ	299
Ce-CyL1	STPFHWFEAFDTSRDVEAIALQLVGLYARRTFPNWPRIKAELDALRSVKDAEMKAVKAK	360
Sp-Plh1	---KDWRVFDITKEEIDSLTSILENFYKTSIAIAHKTLYLIFTEQVSA-----	258
	. * : * : : : : : : : : : : :	
Hs-CyL1	NPDGTPALSTLGGFSPASKPSSPREVKAEKSPISINVKTVKKEPEDRQQASKSPYNGVR	380
Mm-CyL1	NLDGTPALSTLGGFSPASKPSSPREVKAEKSPVSINVKTVKKEPEDRQQASKSPYNGVR	386
Dr-CyL1	NPNGTPALASINGFSPASKPSSPRDVKMDDKSPNSK-----LKEPENRQLFAKSPLNGSI	354
Ce-CyL1	EIAENLAKMAPDGEKSTSTVTIGK-----DSRKVSPDRKNGTK	398
Sp-Plh1	-----	
Hs-CyL1	KDSKRSRNSRSASRSRSTRSRSRSHTPRRHYNNRRSRSGTYSSRSRSHSESPRRH	440
Mm-CyL1	KDSKRSRSTRSASRSRSTRSRSRSHSPRRHYNNRRSRSGTYSSRSRSHSESPRRH	446
Dr-CyL1	K--KEDGKVFQNGKNHSRSTRSRSPHRH---RRSHSGTYSSH-----SHSPSPRQK	404
Ce-CyL1	DRGEADRGGKEKDRHRRRSNDRD-----	421
Sp-Plh1	-----	
Hs-CyL1	HNHGSPHLKAKHTRDDLKSSNRHGHKRRKKSRSRSQSKSRD--HSDAAKKHRHER---GHH	495
Mm-CyL1	HNHGSPHLKAKHTREDLKSSNRHGHKRRKKSRSRSQSKTRD--HSDVTKKHRHER---GHH	501
Dr-CyL1	ARRPSPISQLRTDRDRPSETSRHSNKRNRSRSRSRNSRERVDRDHIKHKQERSGSGHH	464
Ce-CyL1	-GRGDRDRDKDRGDRRKDEKKDRRKRTSRSRDRDKDKNR-----N	461
Sp-Plh1	-----	
Hs-CyL1	RDRRERSRSFERSH-KSKHHGGSRSRGH--RHRR	526
Mm-CyL1	RDRRERSRSFERSH-KGKHHGGSRSRGH--RHRR	532
Dr-CyL1	WDHRDRERDRSRDHGRNKRQSRSHSGHSHSRHRR	498
Ce-CyL1	RDVGKRYRKESSTPPRSR-----	480
Sp-Plh1	-----	

**Figure 13.** Alignement multiple de séquences protéiques de Cycline L réalisé par ClustalW (Hs : Homo sapiens, Mm : Mus musculus, Dr : Danio rerio, Ce : Caenorhabditis elegans, Sp : Schizosaccharomyces pombe). Le symbole « \* » signifie que les résidus sont identiques (conservés), le symbole « : » signifie qu'il y a eu substitution conservée et le symbole « . » signifie qu'il y a eu substitution semi-conservée.

Cet alignement montre que, contrairement à Cdk11 et ses orthologues, l'homologie avec les autres membres de la famille des cyclines L est faible. Il s'agit d'un trait habituel des cyclines qui manifestement sont soumises à une pression de sélection moins élevée sur leur séquence primaire.

Plus intrigant est le fait que la cycline L de *S. pombe* est nettement plus petite que ses orthologues. En fait, le domaine C-terminal riche en arginines et sérines (répétitions RS),

typique des protéines d'épissage (voir introduction), semble complètement absent chez *S. pombe*. Nous reviendrons plus loin sur cette caractéristique.

Une recherche similaire de type BLAST sur le protéome prédit de *S. cerevisiae* ne révèle aucun candidat intéressant. Ceci est en accord avec le fait que, comme Cdk11, la cycline L est absente chez cette levure. Sur base de ces données, nous avons nommé la séquence de *S. pombe* Plh1 (Pombe L-type Cyclin Homologue). La formation d'un complexe entre Cdk11 et Plh1 a ensuite été testée chez *S. pombe* par coimmunoprécipitation.

### 3.1.2 Coimmunoprécipitation de Plh1-TAP-Cdk11-myc

La coimmunoprécipitation permet de tester une interaction entre deux protéines distinctes. Cette technique repose sur le concept que si la précipitation d'une protéine d'un extrait cellulaire entraîne celle d'une autre, il est probable que ces deux protéines fassent partie d'un même complexe *in vivo*.

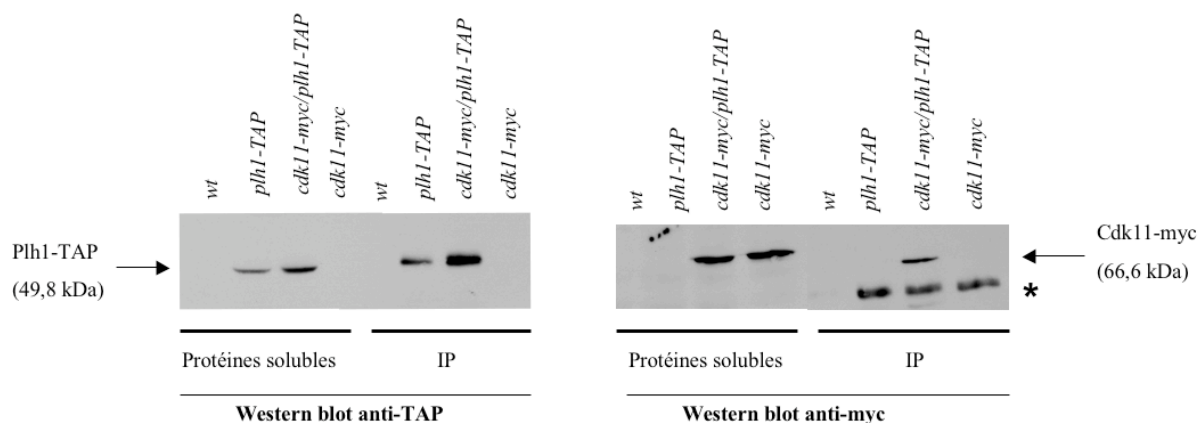
Nous avons profité ici de la facilité d'introduire aux loci d'intérêt un tag reconnu par des anticorps fiables. La première protéine est précipitée sur billes grâce aux anticorps spécifiques de son tag, et un Western Blot détecte ensuite la présence d'une autre protéine coimmunoprécipitée grâce aux anticorps spécifiques du second tag utilisé.

Les protéines ayant naturellement de l'affinité pour les billes, des contrôles stricts sont de rigueur, et pour cette expérience, nous avons utilisé les quatre souches suivantes:

- Une souche double taggée exprimant d'une part la protéine Plh1 fusionnée au tag TAP et d'autre part la protéine Cdk11 fusionnée au tag myc (*plh1-TAP cdk11-myc*)
- Une souche dans laquelle Plh1 est fusionnée au tag TAP (*plh1-tap*).
- Une souche dans laquelle Cdk11 est fusionnée au tag myc (*cdk11-myc*).
- Une souche sauvage non taggée (*wt*).

Pour chaque souche, les cellules ont été cultivées (cultures de 50 ml), culottées, et les protéines solubles extraites. Ensuite, une immunoprécipitation via des billes magnétiques couplées à des IgG, a été réalisée pour précipiter les protéines TAP taggées. Après lavages, les protéines précipitées pour les quatre souches ont été séparées par SDS-PAGE et deux Westerns Blots ont été effectués avec les anticorps spécifiques anti-myc et PAP (Figure 14).

Le Western Blot anti-TAP révèle premièrement que Plh1-TAP est correctement exprimée et présente dans l'extrait soluble, et deuxièmement qu'elle est aussi correctement précipitée par les billes IgG. Le Western Blot anti-myc confirme que les souches utilisées expriment Cdk11-myc qui est spécifiquement coprécipitée par Plh1-TAP. En effet, Cdk11-myc n'est pas détectée après immunoprécipitation en l'absence de Plh1-TAP.



**Figure 14.** Coimmunoprécipitation Plh1-TAP/Cdk11-myc. Les protéines solubles et les protéines immunoprécipitées (anti TAP) et les protéines solubles des souches wt, plh1-TAP, cdk11-myc et plh1-TAP/cdk11-myc ont été séparées par SDS-PAGE. Un Western Blot utilisant l'anticorps PAP et un Western Blot utilisant l'anticorps anti-myc ont été réalisés.

\* Ces bandes apécifiques correspondent probablement aux chaînes lourdes des anticorps utilisés lors de la immunoprécipitation.

Cette expérience montre que Plh1 et Cdk11 interagissent dans un complexe soluble chez *S. pombe*. Nous concluons qu'un complexe apparenté au complexe Cdk11-Cyclin L existe chez *S. pombe*. Ce résultat nous a incité à déterminer si Cdk11-Plh1 faisait partie d'un complexe plus large dont les partenaires pourraient nous éclairer sur le rôle biologique de la kinase.

## 3.2 Tandem Affinity Purification et identification de partenaires

### 3.2.1 Principe de la purification TAP

La purification TAP (Tandem Affinity Purification) est une double purification par affinité en série, qui permet d'atteindre un excellent niveau de pureté du produit d'élution par l'utilisation consécutive de deux tags d'affinité aux propriétés différentes. Couplée à la spectrométrie de masse, elle constitue une technique de choix pour identifier les partenaires d'une protéine d'intérêt.

Le TAP-tag est une « étiquette » d'environ 20 kDa constituée de trois parties:

- Un domaine de liaison aux IgG provenant de la protéine A de *Staphylococcus aureus*
- Un site de clivage spécifique de la protéase TEV
- Le CBP (Calmodulin Binding Peptide), un peptide possédant une forte affinité pour la calmoduline en présence de calcium

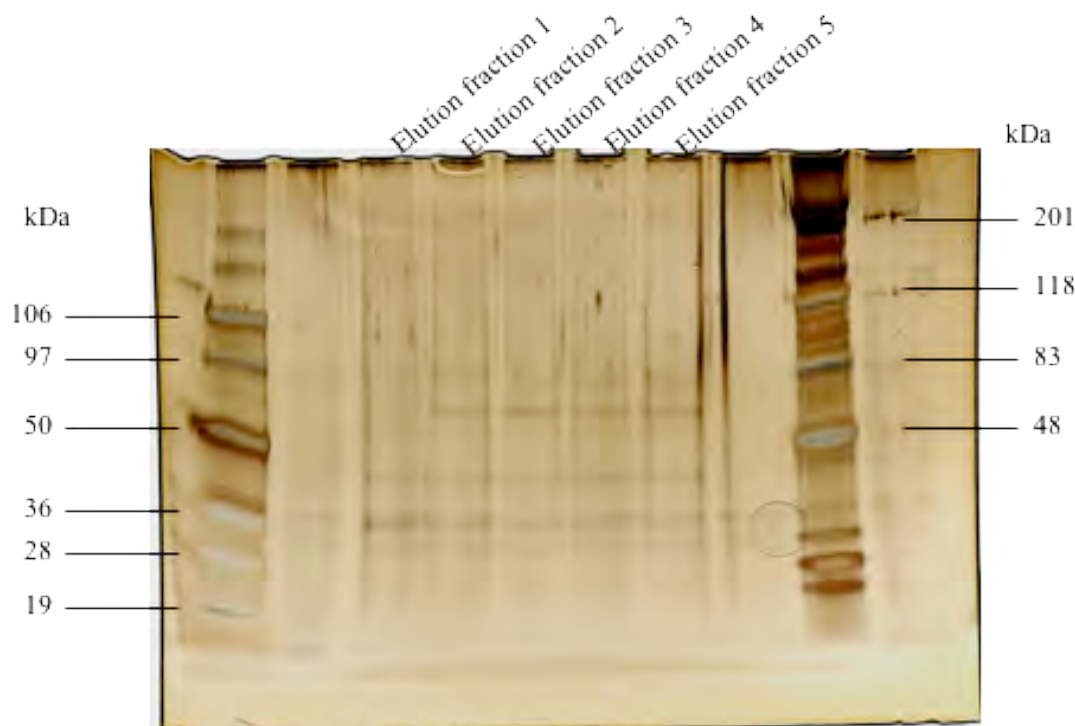
Le principe de la purification TAP (Figure 15) est de faire passer, à la suite, dans deux colonnes d'affinité, un extrait soluble de protéines provenant d'une souche exprimant la protéine d'intérêt fusionnée au TAP tag. La première colonne contient des billes d'agarose couplées à des IgG qui ont une affinité très forte pour le domaine de liaison aux IgG du tag.

L'élution se fait par un clivage par la TEV protéase. La deuxième colonne contient des billes de sépharose couplées à la calmoduline qui va fixer le CBP. L'élution se fait en présence d'EGTA, un agent chélatant le calcium, requis pour l'interaction entre le CBP et la calmoduline.

### 3.2.2 Purification Cdk11-TAP

Nous avons dans un premier temps réalisé une purification TAP sur un extrait soluble préparé à partir d'une souche exprimant Cdk11 fusionnée au TAP tag. En bref, nous avons inoculé 12 litres de culture et après une nuit de croissance, les cellules ont été récoltées et lysées pour extraire les protéines solubles.

Après la double purification, cinq fractions d'élution ont été collectées et un aliquot de chaque fraction a été séparé sur un gel en gradient SDS-PAGE (Precast Polyacrylamide Mini Gels Pierce) puis coloré à l'argent (SilverQuest Silver Staining Kit Quiagen) (Figure 16).



**Figure 16.** Purification TAP de Cdk11. Les fractions d'élution ont été séparées par SDS-PAGE et le gel a été coloré à l'argent.

Plusieurs bandes d'intensité très faibles sont visibles sur le gel, indiquant que Cdk11 fait potentiellement partie d'un complexe. Les bandes ont été isolées et analysées par spectrométrie de masse. Aucun résultat n'a été obtenu à partir du gel, probablement à cause de la très faible quantité de protéines présentes.

Après traitement, le reste du produit purifié a directement été injecté dans le spectromètre pour éviter au maximum les pertes. Il en a résulté l'identification des protéines suivantes :

- SPAC23C4.19 – Spt5 (régulateur de la transcription)
- SPBC354.12 – Gpd3 (enzyme métabolique)
- SPBP8B7.16c – Dbp2 (RNA hélicase)
- SPCC794.09c – Tef1 (facteur d'élongation de la traduction)
- SPBC12D12.03 – Cct1 (protéine chaperone)
- SPAC13G6.02c – Rps1 (protéine ribosomale)
- SPCC1795.11 – Ded1 (RNA hélicase)
- SPAC24C9.12c – (enzyme métabolique)
- SPBC21C3.16c – Spt4 (régulateur de la transcription)
- SPBC685.06 – Rps9 (protéine ribosomale)

Aucune trace de Cdk11 ou Plh1 n'a été trouvée lors de ces analyses, mettant fortement en doute la relevance des protéines identifiées. Toutefois, la présence de Spt5 et Spt4 qui forment le complexe DSIF (voir introduction) nous a incité à réaliser une expérience supplémentaire pour tester leur interaction avec Cdk11-Plh1.

### 3.2.3 Vérification de l'interaction potentielle Cdk11-Spt5

Chez les eucaryotes supérieurs, les protéines Spt4 et Spt5 forment un complexe appelé 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) sensitivity-inducing factor (DSIF) et jouent un rôle dans l'élongation de la transcription. En effet, il a été démontré que le complexe DSIF induit un arrêt de l'élongation de la transcription (Wada et al., 1998).

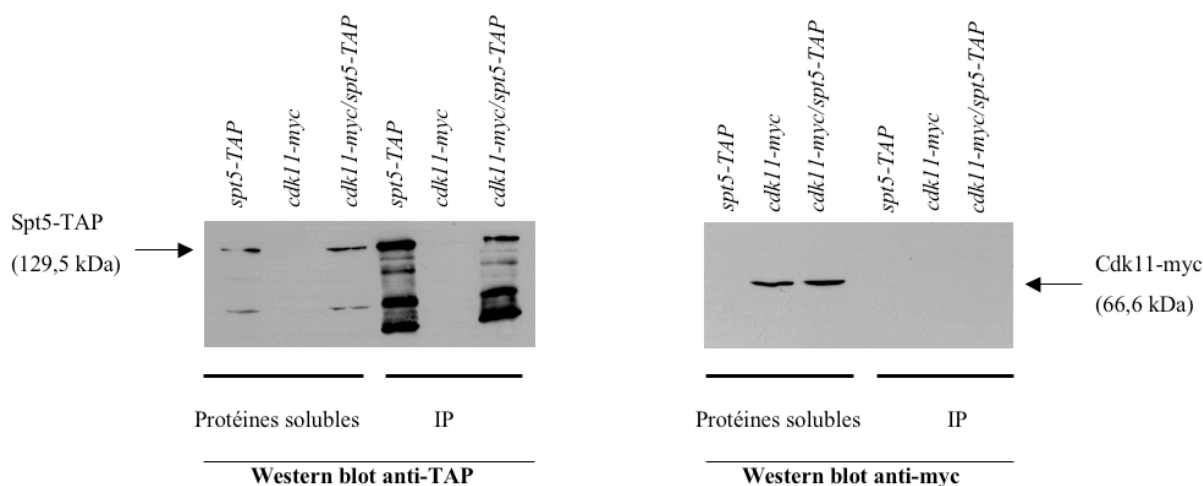
Chez les levures sont trouvés les protéines homologues Spt4/Spt5. Celles-ci forment également un complexe, bien caractérisé, impliqué dans l'élongation de la transcription par Pol II. Cdk11 étant apparentée phylogénétiquement aux Cdk « transcriptionnelles », il est dès lors possible que Cdk11 et Spt5 interagissent. Nous avons étudié cette interaction par une coimmunoprécipitation des protéines Cdk11-myc et Spt5-TAP d'une manière identique à la coimmunoprécipitation entre Cdk11 et Plh1.

Pour cette expérience, nous avons utilisé quatre souches différentes :

- Une souche double taggée exprimant d'une part la protéine Spt5 fusionnée au tag TAP et d'autre part la protéine Cdk11 fusionnée au tag myc (*spt5-TAP cdk11-myc*).
- Une souche dans laquelle Spt5 est fusionnée au tag TAP (*spt5-TAP*).
- Une souche dans laquelle Cdk11 est fusionnée au tag myc (*cdk11-myc*).

Pour chaque souche, les cellules ont été cultivées (cultures de 50 ml), culottées, et les protéines solubles extraites. Ensuite, une immunoprécipitation via des billes magnétiques couplées à des IgG, a été réalisée pour précipiter les protéines TAP taggées. Après lavages, les protéines précipitées pour les quatre souches ont été séparées par SDS-PAGE et deux Westerns Blots ont été effectués avec les anticorps spécifiques anti-myc et PAP (Figure 17).

Le Western Blot anti-TAP révèle que premièrement, Spt5-TAP est correctement exprimée et présente dans l'extrait soluble, et que deuxièmement elle est correctement précipitée par les billes IgG. Nous avons cependant noté, particulièrement après immunoprécipitation, des formes tronquées en N-terminal qui résultent sans doute d'une instabilité de Spt5 dans ces conditions.



**Figure 17.** Coimmunoprécipitation Spt5-TAP/Cdk11-myc. Les protéines solubles et les protéines immunoprécipitées (anti TAP) des souches spt5-TAP, cdk11-myc et spt5-TAP/cdk11-myc ont été séparées par SDS-PAGE. Un Western Blot utilisant les anticorps PAP et un Western Blot utilisant les anticorps anti-myc ont été réalisés.

Le Western Blot anti-myc confirme que les souches utilisées expriment Cdk11-myc qui n'est pas détectée après immunoprécipitation de Spt5-TAP (Figure 17). A ce stade, compte tenu des réserves émises plus haut sur les résultats de la spectrométrie et des difficultés à maintenir une forme unique de Spt5 pendant l'immunoprécipitation, nous avons préféré ne pas poursuivre l'analyse de l'hypothétique interaction entre Spt5 et Cdk11 en l'absence de nouvelles données.

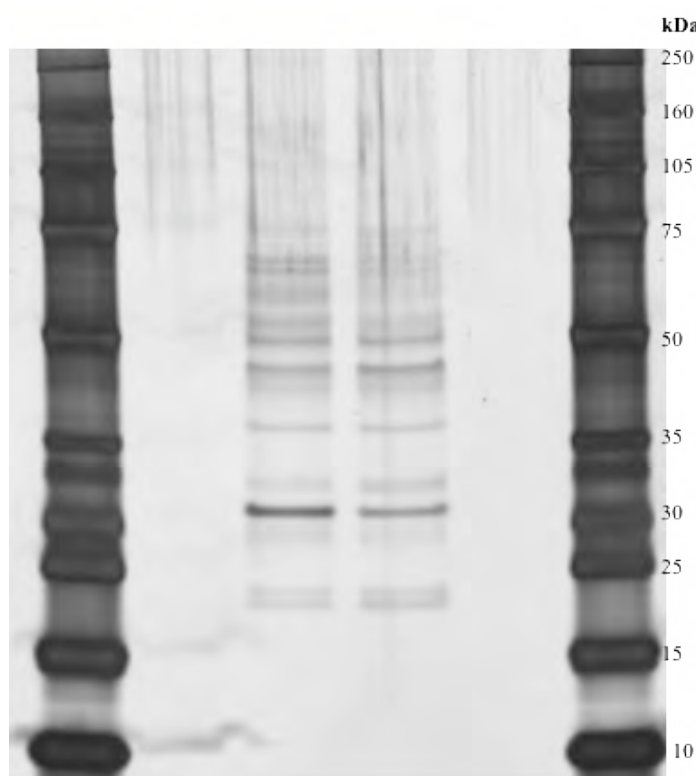
### 3.2.4 Purification Plh1-TAP

La difficulté d'obtenir des données fiables de la spectrométrie résultant probablement du faible rendement de la purification, celle-ci a été répétée sans plus de succès. Nous avons alors tenté de purifier le complexe en utilisant la cycline Plh1 comme appât.

Une purification réalisée dans les mêmes conditions a été réalisée. Après séparation des fractions d'élution sur SDS-PAGE et coloration à l'argent, une quinzaine de bandes étaient clairement visibles (Figure 18).

Pour éviter les pertes inhérentes au passage sur gel, les fractions d'élution ont été rassemblées, concentrées et injectées après traitement dans le spectromètre par le kit Dynabeads RPC Protein (Dynal biotech). Il en a résulté l'identification des protéines suivantes :

- SPBC18H10.15 – Cdk11
- SPAC1296.05c – Plh1
- SPBP8B7.16c – Dbp2 (RNA hélicase)
- SPCC1795.11 – Ded1 (RNA hélicase)
- SPAC3H1.03 – régulateur transcriptionnel HCNGP-like
- SPBC12D12.03 – Cct1 (Chaperone)
- SPCC1739.13 – Ssa2 (heat shock protein)
- SPBC4F6.04 – Rpl2502 (protéine ribosomale)
- SPCC16C4.11 – Pef1 (Cdk)
- SPAC3C7.06c – Pit1 (Kinase)
- SPAC13G6.02c – S3a (protéine ribosomale)
- SPCC576.08c – S2 (protéine ribosomale)



**Figure 18.** Purification TAP de Plh1. Les fractions d'élution ont été séparées par SDS-PAGE et le gel a été coloré à l'argent.

Le fait que Cdk11 et Plh1 aient été identifiées indique que la purification a fonctionné et confirme les données de coimmunprécipitation entre Cdk11 et Plh1, c'est-à-dire que Cdk11 et Plh1 forment un complexe soluble *in vivo* chez *S. pombe*.

De plus, les protéines Dbp2, Ded1 et Cct1 ont également été détectées lors de la purification TAP de Cdk11. Dès lors, nous pouvons supposer que Cdk11 et Plh1 font partie d'un complexe plus large chez *S. pombe*.



## 4 Etude de l'activité kinase de Cdk11-Plh1

Les Cdk « transcriptionnelles » Cdk7, Cdk8 et Cdk9 régulent la transcription en phosphorylant les résidus sérine 2 et 5 du domaine C-terminal de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II. Comme Cdk11 est clairement apparentée à cette sous-famille des Cdk, nous avons voulu déterminer si Cdk11 est capable de phosphoryler le CTD *in vitro*. Des tests d'activité ont été réalisés en utilisant une fusion GST-CTD recombinante comme substrat.

### 4.1 Test d'activité *in vitro*

Le test kinase *in vitro* consiste à précipiter la protéine d'intérêt à partir d'un extrait cellulaire et à la mettre en présence du substrat à tester dans un tampon adéquat contenant de l'ATP dont le phosphate en position gamma est radiomarké. Ensuite, le surnageant contenant le substrat est séparé sur SDS-PAGE et le gel est exposé. Comme contrôle positif, nous avons précipité la kinase Mcs6, l'orthologue de Cdk7 chez *S. pombe*.

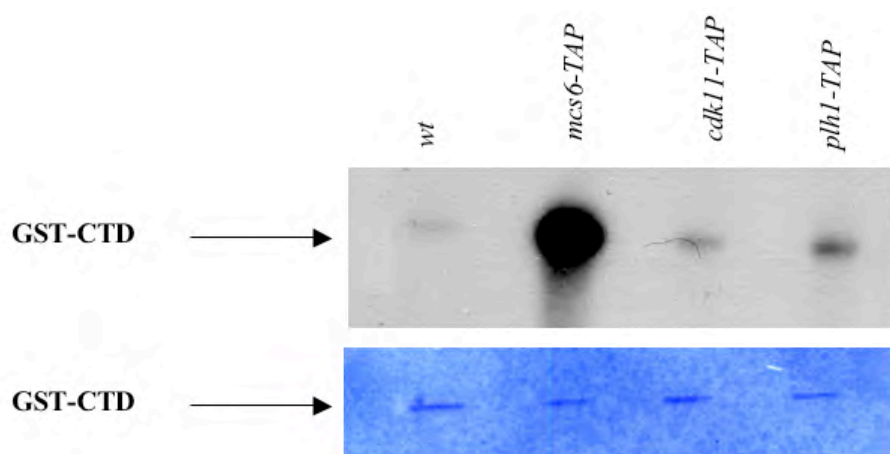
Nous avons utilisé, pour cette expérience, quatre souches :

- Une souche sauvage (contrôle négatif) (*wt*)
- Une souche exprimant Mcs6 fusionnée au TAP tag (contrôle positif) (*mcs6-TAP*)
- Une souche exprimant Cdk11 fusionnée au TAP tag (*cdk11-TAP*)
- Une souche exprimant Plh1 fusionnée au TAP tag (*plh1-TAP*)

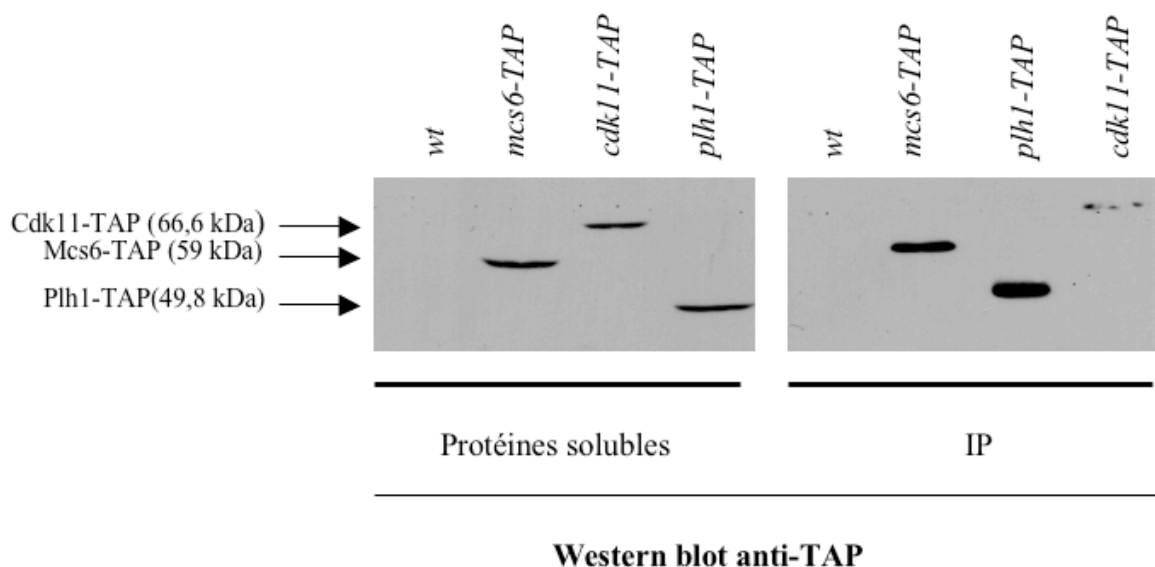
Des cultures de ces quatre souches ont été inoculées à 32°C, culottées et les protéines solubles extraites. Ensuite, une immunoprécipitation sur des billes magnétiques chargées d'IgG, a été réalisée pour précipiter les protéines TAP taggées. Après plusieurs lavages, un tampon contenant l'ATP dont le phosphate en position gamma est radiomarké par la présence d'un isotope 32 du phosphore et le GST-CTD est ajouté aux billes pendant 30 minutes à 30°C (voir Matériel et Méthode).

Après séparation sur SDS-PAGE, le gel a été exposé durant 12 h puis le film a été révélé (Figure 19). Une bande migrant à la taille attendue due GST-CTD (48 kDa) indique que la réaction *in vitro* est positive. Comme le montre la Figure 19, une bande intense est, comme attendu, observée quand Mcs6-TAP est précipitée. Ni Cdk11, ni Plh1 ne présente une activité kinase marquée pour le CTD *in vitro*. Une variation de quantité de substrat GST-CTD utilisé ne peut pas être invoquée pour expliquer ces différences d'activité comme le montre la coloration du gel au bleu de Coomassie (Figure 19).

Pour vérifier que la très faible activité kinase détectée pour Cdk11 et Plh1 n'est pas due à un défaut d'immunoprécipitation, nous avons prélevé une fraction des protéines précipitées avant la réaction kinase pour les séparer sur SDS-PAGE suivi d'un Western Blot avec l'anticorps PAP (Figure 20). Une fraction de l'extrait soluble avant immunoprécipitation est également chargée sur le gel (Figure 20).



**Figure 19.** Test kinase *in vitro*. Une immunoprécipitation anti-TAP a été réalisée sur les protéines extraites des souches wt, mcs6-TAP, cdk11-TAP et plh1-TAP. Les protéines immunoprécipitées ont été utilisées pour le test kinase *in vitro* sur le CTD de la polymérase II. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.



**Figure 20.** Les protéines immunoprécipitées (anti TAP) utilisées pour le test kinase *in vitro* et les protéines solubles ont été séparées par SDS-PAGE et un Western Blot anti-TAP a été réalisé.

Cette expérience montre que les protéines TAP-tagguées sont correctement exprimées dans les différentes souches utilisées et que Mcs6-TAP et Plh1-TAP ont été précipitées en quantité similaire alors que Cdk11-TAP a été précipitée en plus faible quantité. Le résultat de la Figure 19 ne peut donc pas être expliqué par un problème d'expression ou de précipitation, en particulier en ce qui concerne Plh1.

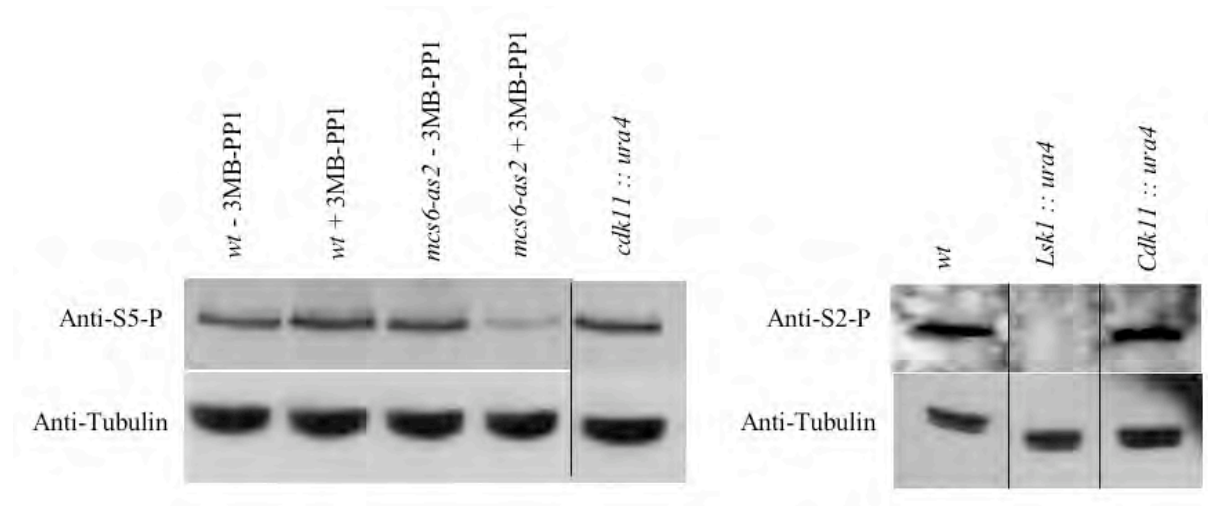
Nous concluons que Cdk11-Plh1 présente une activité kinase très faible pour le CTD *in vitro*. Ceci permet de mettre en question le fait que, comme les autres kinases de la sous-famille des Cdk transcriptionnelles, Cdk11 phosphorylerait le CTD *in vivo*. Pour aborder plus directement cette question, nous avons étudié l'effet de la délétion de *cdk11* chez *S. pombe* sur l'état de phosphorylation du CTD *in vivo*.

## 4.2 Effet de l'absence de Cdk11 sur le degré de phosphorylation du CTD *in vivo*.

L'existence d'anticorps reconnaissant spécifiquement le CTD phosphorylé sur la sérine 2 ou la sérine 5 (Thompson et al., 1989) a été décisive dans la description des états de phosphorylation de celui-ci au cours du cycle transcriptionnel. Un Western Blot permet de sonder le niveau de phosphorylation sur un extrait total de *S. pombe*.

Nos contrôles dans cette expérience consistent en une souche *mcs6-as2* qui permet l'inhibition spécifique de l'activité de Mcs6 en présence d'un analogue d'ATP (génétique chimique) (Shokat and Velleca, 2002). Mcs6 (Cdk7 chez *S. pombe*) étant la kinase principale de la sérine 5, son inhibition résulte en une diminution de la phosphorylation de la sérine 5. Notre second contrôle est une souche délétée pour *lsk1*, la kinase principale de la sérine 2 chez *S. pombe* (il faut noter que contrairement aux autres espèces, Cdk9 a un effet minoritaire sur la phosphorylation de la sérine 2 chez *S. pombe*).

En comparant ces contrôles avec la souche *cdk11::ura4* et une souche sauvage, nous pouvons déterminer si la délétion de *cdk11* a un effet sur l'état de phosphorylation des sérines 2 et 5 du CTD. Nous avons inoculé des cultures de ces souches, traité les cellules le cas échéant avec un analogue de l'ATP (3-MB-PP1) et enfin préparé des extraits totaux. Ceux-ci ont été séparés par SDS-PAGE suivi d'un Western Blot en utilisant les deux anticorps dirigés soit contre la sérine 2 phosphorylée soit contre la sérine 5 phosphorylée (Figure 21).



**Figure 21.** Les extraits de protéines totales ont été séparés par SDS-PAGE et un Western Blot utilisant les anticorps (A) anti-sérine 2 phosphorylée et (B) anti-sérine 5 phosphorylée a été réalisé. Un Western Blot anti-tubuline a été réalisé pour contrôler la quantité de protéines chargées dans chaque puits.

L'addition de l'analogue résulte en une diminution spécifique de la quantité de sérine 5 phosphorylée dans la souche *mcs6-as2* alors que l'absence de *cdk11* n'a pas d'effet. D'une manière similaire, l'absence de *lsk1* abolit la détection de la sérine 2 phosphorylée alors que celle de *cdk11* ne l'affecte pas.

Ces expériences ne permettent pas de mettre en évidence un rôle de Cdk11 sur la phosphorylation du CTD. Il est possible qu'une redondance d'activité entre les différentes CTD kinases masque un effet de Cdk11 mais cette hypothèse est peu probable dans la mesure où l'activité kinase de Cdk11-Plh1 sur le CTD *in vitro* est négligable.

## 5 Localisation de Cdk11 sur la chromatine

Si Cdk11 est impliquée dans la régulation de la transcription, la protéine devrait être détectable sur la chromatine. C'est le cas de Mcs6, Cdk9 et Lsk1 chez *S. pombe* qui régulent, notamment en phosphorylant le CTD, la transcription. Pour tester cette possibilité, nous avons réalisé des analyses ChIP (Chromatin Immunoprécipitation) qui permettent de cartographier la position d'une protéine d'intérêt sur la chromatine.

Pour ce type d'expérience, nous avons utilisé une souche exprimant Cdk11 fusionnée au tag HA. En bref, les cellules ont d'abord été traitées avec du formaldéhyde pour fixer (« cross link ») les interactions protéines-protéines et protéines-ADN par des liens covalents. Ensuite, la chromatine fixée a été fragmentée par sonication pour générer de petits fragments aléatoires de chromatine. Les fragments associés à Cdk11 ont été immunoprécipités par des billes magnétiques « coatées » avec des IgG anti-HA. La présence de fragments spécifiques est quantifiée par PCR en temps réel (Figure 22).

Le locus *act1* a été choisi pour cette analyse pour son taux de transcription constitutive élevé et son utilisation en routine au laboratoire. Nous avons utilisé quatre paires d'amorces générant 4 amplicons, dont un correspond à la région du promoteur, les deux suivants à la phase ouverte de lecture et le dernier dans la région de terminaison. Un amplicon a également été choisi dans une région intergénique non transcrite qui sert de contrôle négatif. Une analyse similaire mais avec une souche exprimant la sous-unité Rpb3 de la polymérase taggée avec HA sert de comparaison. Enfin, l'expérience est réalisée en duplicat biologique.

Cette expérience que nous considérons comme pilote montre un enrichissement spécifique de Cdk11 sur la région 3' de l'ORF (Figure 22).

# Discussion, conclusions générales et perspectives

## 1 Discussion et Conclusions générales

Les kinases dépendantes de cyclines constituent une famille très conservée chez les eucaryotes et jouent un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire et de la transcription. La sous-famille des Cdks dites « transcriptionnelles » comporte cinq groupes : Cdk7, Cdk8, Cdk9, Ctk1 et Cdk11, avec au moins un représentant dans les organismes modèles étudiés. La seule exception notable est Cdk11 dont aucun homologue n'est apparent chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

L'objectif de ce mémoire était d'entamer la caractérisation de Cdk11 chez *S. pombe*, d'abord parce que très peu de choses sont connues sur le rôle de cette kinase et aussi parce que son absence chez les levures bourgeonnantes pose question. Bien que d'autres substrats soient parfois établis, les autres membres de la sous-famille des Cdks transcriptionnelles jouent tous un rôle dans la régulation de la transcription par la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II, Rpb1.

Il est donc raisonnable de postuler que c'est aussi le cas de Cdk11, et ceci a constitué notre hypothèse de départ. Peu de choses sont connues sur Cdk11 dans d'autres espèces, mais plusieurs évidences convergent vers un rôle dans le processing des pré-mRNA et particulièrement l'épissage. Enfin, il est clair que la kinase existe sous plusieurs isoformes de taille différente chez les eucaryotes supérieurs.

Dans un premier temps, nous avons identifié et analysé la séquence homologue à Cdk11 chez *S. pombe*, ce qui a révélé que seul l'équivalent de l'isoforme dite « p58 » était encodée dans le génome de *S. pombe*. Cette observation n'est pas anecdotique car p58 est spécifiquement exprimée en mitose et joue un rôle dans la stabilisation du fuseau mitotique, soulevant l'hypothèse que SpCdk11, bien qu'apparentée aux Cdks transcriptionnelles, puisse jouer un rôle exclusif dans le cycle cellulaire. L'analyse du niveau d'expression de SpCdk11 dans une culture synchronisée a révélé qu'elle était exprimée constitutivement durant le cycle cellulaire.

La localisation de SpCdk11, observée grâce à une fusion GFP exprimée depuis le locus endogène, est clairement nucléaire, y compris en mitose. Des « patchs » cytoplasmiques sont parfois visibles mais ils ne rappellent en rien la morphologie des microtubules. De plus, une souche délétée pour *cdk11* ne montre pas de sensibilité au thiabendazole (Julie Drogat, communication personnelle), une drogue qui déstabilise les microtubules et à laquelle des souches mutées pour des régulateurs de la tubuline sont particulièrement sensibles.

Ces données mettent à mal l'hypothèse d'un rôle de SpCdk11 limité à la mitose, et la localisation nucléaire, excluant largement le nucléole renforce au contraire un rôle lié à la chromatine et l'ARN polymérase II.

L'identification des partenaires physiques d'une protéine renseigne souvent sur le rôle de celle-ci dans la cellule. De plus, Cdk11 étant prédite comme une kinase dépendante d'une cycline, nous avons cherché à identifier les protéines associées avec elle *in vivo* chez *S.*

*pombe*. La littérature rapporte une interaction entre Cdk11<sup>p110</sup> et la cycline L (Dickinson et al., 2002), ce qui nous a amené à rechercher si un homologue des cyclines L était encodé dans le génome de *S. pombe*. Celui-ci a été facilement identifié et nommé Plh1 (*pombe* cyclin L homologue). La coimmunoprécipitation de Cdk11 et Plh1, et l'identification de Cdk11 par spectrométrie de masse après purification de Plh1, montrent qu'un complexe soluble contenant ces deux protéines existe *in vivo* chez *S. pombe*.

Une approche large de type protéomique pour identifier les partenaires de Cdk11-Plh1 s'est révélée laborieuse à cause des très faibles quantités de protéines purifiées. Que Cdk11 ou Plh1 soient utilisées comme appât, certaines protéines isolées sont probablement des faux positifs. En effet, l'expérience du laboratoire montre que des protéines liées à la traduction, des enzymes métaboliques et des protéines de choc thermique ressortent systématiquement de ce type de purifications même quand les appâts ne sont pas apparentés et jouent un rôle dans des voies cellulaires très différentes. Nous faisons donc le choix de ne pas considérer ces protéines plus en détail.

Au contraire nous retenons trois protéines comme candidats interacteurs avec Cdk11-Plh1 : les RNA hélicase Dbp2 et Ded1, et le facteur de transcription de la famille HCNGP.

Les deux premières sont ressorties aussi bien avec Cdk11 ou Plh1 comme appât (en gardant à l'esprit les réserves que nous avons émises plus tôt sur la purification de Cdk11) et la troisième est une protéine présente chez tous les eucaryotes à l'exception de *S. cerevisiae*, ce qui est réminiscent de Cdk11-Plh1.

Peu de choses sont connues de la RNA hélicase Ded1, mais p68, nommée Dbp2 chez *S. pombe*, fait partie de la famille des protéines « DExD/H box ». Ces protéines présentent une séquence très conservée DExD/H (x pouvant être remplacé par n'importe quel acide aminé) et possèdent une activité RNA hélicase. Cette famille est impliquée dans des processus variés qui requièrent ou non son activité hélicase. Elles sont connectées à la transcription comme co-activateur de facteurs de transcription, interviennent directement dans l'épissage et dans la dégradation des messagers contenant un codon STOP prématuré (Non-sense mediated mRNA decay ou NMR) (Fuller-Pace, 2006).

Il faut souligner que le NMR, bien qu'initialement décrit comme un « checkpoint » empêchant la production de protéines tronquées aux effets potentiellement négatifs, régule aussi l'équilibre entre les niveaux de messagers impliqués dans différents processus cellulaires, et régule l'expression d'environ 3 à 10 % du transcriptome (Stalder and Muhlemann, 2008).

Dbp2, comme le facteur de transcription du type HCNGP (dont rien n'est connu) nous ramène donc à la transcription, et à l'épissage. L'absence de Cdk11-Plh1 chez *S. cerevisiae* rappelle d'ailleurs le très faible nombre d'introns présents chez cette levure : quelques pour-cent des gènes de *S. cerevisiae* sont interrompus par des introns contre près de la moitié chez *S. pombe* et plus encore chez les eucaryotes supérieurs.

Le lien entre Cdk11 et l'épissage constitue donc une hypothèse de travail sérieuse qu'une constatation vient toutefois tempérer. La cycline L des eucaryotes supérieurs possède un domaine riche en répétition RS (arginine-sérine) typique des protéines d'épissage, mais ce domaine est spécifiquement absent chez Plh1. Les protéines SR se lient à de petits ARN et orchestrent la formation du spliceosome. Chez les métazoaires, neuf familles de protéines SR

existent alors que seulement deux protéines SR sont retrouvées chez *S. pombe* et que *S. cerevisiae* en est totalement dépourvue (Ram and Ast, 2007) et (Kaufer and Potashkin, 2000).

Le lien entre Cdk11 et la transcription n'est pas démenti par nos résultats mais des données supplémentaires seront nécessaires pour l'explorer complètement.

Comme nous l'avons dit, la première connexion entre Cdk11 et la transcription est son appartenance à la famille des kinases du CTD. Nous avons voulu déterminer si SpCdk11, est une kinase régulant la transcription en phosphorylant le CTD de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II. Dans cette optique, nous avons réalisé des tests kinase *in vitro* et étudié l'effet de la délétion de *cdk11* sur l'état de phosphorylation du CTD *in vivo*.

Les résultats obtenus suggèrent que SpCdk11 ne possède pas d'activité CTD kinase et aucune modification de l'état de phosphorylation du CTD n'est observée en absence de *cdk11*. Ces résultats confirment des données éparées de la littérature et posent la question de l'association de Cdk11 avec la chromatine. Par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons observé un enrichissement modeste de Cdk11 dans la région 3' du gène *act1*, un locus bien caractérisé chez *S. pombe*. Au laboratoire, des expériences de ChIP-on-chip où le produit de l'immunoprécipitation de chromatine est hybridé sur des microarrays couvrant l'entièreté du génome ont montré une association significative de Cdk11 sur près de 900 loci avec un enrichissement dans les régions 3' de ceux-ci. La même expérience réalisée avec une sous-unité de la polymérase II montre deux fois plus de loci enrichis (Damien Hermand, communication personnelle). Ces données suggèrent que Cdk11 est recrutée sur un grand nombre de gènes transcrits par Pol II mais pas sur tous. Une analyse détaillée de ces résultats est en cours.

En conclusion, ce travail a permis d'établir l'existence d'un complexe apparenté à Cdk11-Cyclin L chez *S. pombe*. A plus d'un titre, Cdk11-Plh1 ne reflète qu'imparfaitement son homologue chez le métazoaire. Les protéines sont plus courtes et des domaines entiers sont absents chez *S. pombe*. Il n'en demeure pas moins que ce modèle eucaryote unicellulaire, précisément par sa simplicité, ne devrait pas manquer d'aider à clarifier le rôle de cette kinase dans la cellule.



## 2 Perspectives

Les perspectives directes de ce travail sont évidentes. Les partenaires potentiels révélés par la purification et l'analyse en spectrométrie de Cdk11-Plh1 devront être confirmés par une autre approche. Dans cette optique, il est important de mettre en place une stratégie réaliste qui nous amènera à nous concentrer sur trois des protéines identifiées, comme décrit ci-dessus. L'analyse des effets de la délétion des gènes correspondants, en combinaison ou pas avec l'absence de *cdk11*, est aussi envisagée. Cette approche génétique révélera l'effet cumulatif potentiel des doubles mutants.

Du fait que Dbp2 est la mieux caractérisée des trois protéines candidates, nous pouvons envisager des expériences plus détaillées dans ce cas. Spécifiquement, son rôle dans le « nonsense-mediated mRNA decay » (NMR) et par extrapolation celui de Cdk11 peuvent être facilement testés. Il existe un allèle récessif muté du marqueur *ade6* chez *S. pombe* (*ade6-M26*) qui résulte de l'insertion d'un codon STOP prématuré. Le messager correspondant est rapidement dégradé par le NMR comme le montre sa stabilisation dans des mutants affectant ce processus. En combinant par croisement cet allèle et la délétion de *cdk11*, nous pourrions par un simple northern blot mettre en évidence un rôle de Cdk11 dans le NMR.

La découverte du ou des substrats physiologiques de Cdk11-Plh1 devrait éclairer leur rôle dans la cellule. Une approche à large échelle de génétique chimique est actuellement développée au laboratoire (Julie Drogat) avec cet objectif.

Le lien entre Cdk11 et l'épissage pourra se manifester par l'étude sur microarrays d'altérations spécifiques du transcriptome en l'absence de *cdk11*. Notamment, l'utilisation de lames mettant en évidence des défauts d'épissage est envisagée. Elle pourrait d'ailleurs générer un modèle unifié puisque une publication récente montre que le pathway NMR affecte profondément l'« intronome » en éliminant des pré-mRNA régulés ou épissés de façon suboptimale (Sayani et al., 2008).

Il est donc possible que les divers rôles évoqués pour Cdk11-Plh1 dans le NMR et l'épissage constituent deux aspects d'une même fonction.

# Matériel

## 1 Souches utilisées

<i>cdk11 :: ura4 – cdk8 :: ura4</i>	h+	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11 :: ura4 – cdk9 as-3HA</i>	h-	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11 :: ura4 – lsk 1 :: ura4</i>	h+	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11 :: ura4</i>	h-	<i>nd</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11:: ura4 – mcs6 as2</i>	nd	<i>nd</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-GFP-kanR</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-HA-kanR</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-HA-kanR – plh1-TAP-kanR</i>	nd	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-HA-kanR – spt5-TAP-kanR</i>	h-	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-myc-natR</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-myc-natR</i>	h-	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-myc-natR – plh1-TAP-kanR</i>	h-	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk11-TAP-kanR</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk8 :: ura4</i>	h+	<i>ade (unknown)</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>cdk9 as-3HA</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>lsk1 :: ura4</i>	h-	<i>nd</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>lsk1-3HA-ura4</i>	h-	<i>nd</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>mcs6 as2</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>mcs6-3HA-natR</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>mcs6-TAP-kanR</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>plh1-TAP-kanR</i>	h-	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>plh1-TAP-kanR</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>spt5-TAP-kanR</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>wt</i>	h+	<i>ade6-216</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>
<i>wt</i>	h-	<i>ade6-210</i>	<i>ura4-D18</i>	<i>leu1-32</i>

## 2 Plasmides utilisés

pDH 34	<i>C-TAP 2X (ampR-kanR)</i>
pDH 191	<i>3HA (ampR-kanR)</i>
pDH 272	<i>GFP (ampR-kanR)</i>
pDH 372	<i>13 myc (ampR-kanR)</i>

## 3 Tampons et solutions utilisés

Tampon TAE 50X	242 g Tris, 57,1 mL HAC, 100 mL EDTA 0,5 M pH8
Bleu de chargement pour électrophorèse sur gel d'agarose	Bleu de bromophénol 0,25%, EDTA 25 mM, Glycérol 50%
LiAc-TE	0,1 M LiAc, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA
LiAc-TE-PEG	LiAc-TE + 40% PEG4000
Tampon de chargement pour extraction totale de protéines	60 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% β-mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01% bleu de bromophenol, 5% glycérol
IPP-150	10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40

Tampon NP-40	6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF
PBS 10X (pour 1L)	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Tampon running SDS-PAGE 10X	30,3 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS
Tampon Towbin	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, 20% méthanol
Tampon kinase	20 mM Tris, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM MnCl <sub>2</sub>
TEV-CB	10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT
CBB (Calmodulin binding buffer)	10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg <sup>2+</sup> Acetate, 1 mM Imidazole, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM BME, 0,1%/0,02% NP-40
CEB (Calmodulin elution buffer)	10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg <sup>2+</sup> Acetate, 1 mM Imidazole, 10 mM BME, 0,02% NP-40, 20 mM EGTA
Fa/SDS	50 mM Hepes KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0,1% Na Deoxylate
Tampon Pronase 5X	0,125 M Tris pH 7,5, 25 mM EDTA, 2,5% SDS
Tampon IP	10 mM Tris pH8, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5 % Na deoxylate

# Méthode

## 1 Méthodes relatives à l'ADN et génétique

### 1.1 PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique permettant l'amplification d'un fragment d'ADN. Cette amplification est réalisée grâce à l'hybridation de deux amorces complémentaires à l'ADN cible et à une enzyme thermostable qui permet la polymérisation à partir des extrémités 3' des amorces. La PCR comprend trois étapes. Pour commencer, la dénaturation qui permet la séparation des deux brins d'ADN. Ensuite, il y a l'hybridation des amorces et enfin, l'élongation qui permet la polymérisation des amorces par la polymérase.

Nous avons utilisé la *Taq* DNA polymerase (Promega) pour les PCR sur colonies et l'enzyme Expand High Fidelity (Roche) pour les PCR « gene targeting ».

#### 1.1.1 PCR « gene targeting »

Cette technique profite de l'amplification PCR d'un fragment composé d'un tag associé à un marqueur de sélection (par exemple *TAP-kanR*) pour le border de régions d'homologie d'environ 60 paires de base qui permettront son intégration ciblée à un locus donné (Figure 23).

##### Master Mix (pour 100µL)

Tampon Expand 10X (Mg <sup>2+</sup> inclus)	40 µL
dNTPs (20mM)	20 µL
Primer 1 (100µM)	3,2 µL
Primer 2 (100µM)	3,2 µL
ADN portant la région à amplifier	1,5 µL
Expand polymérase	4 µL
H <sub>2</sub> O	328 µL

##### Cycles PCR

94°C	2'
94°C	30''
50°C	1'
68°C	3'
8X à partir de l'étape n°2	
94°C	30''
58°C	1'
68°C	3'
34X à partir de l'étape 6	
68°C	10'

### 1.1.2 PCR sur colonies

La « PCR sur colonies » est utilisée pour diagnostiquer l'intégration d'un fragment PCR au bon endroit du génome. Ce type de PCR est réalisé directement à partir d'une colonie de levures n'ayant subi aucun traitement préalable (Figure 24).

#### Master Mix (pour 4X100µL)

Tampon 5X	20 µL
dNTPs (20mM)	5 µL
Primer 1 (100µM)	0,7 µL
Primer 2 (100µM)	0,7 µL
H <sub>2</sub> O	73 µL
Levure	L'équivalent d'une pointe de tips
Go taq	0,5 µL après 10 minutes à 100°C

#### Cycles PCR

100°C	10'
94°C	4'
94°C	45''
Tm3°C	30''
72°C	2'
34 X à partir de l'étape 3	
72°C	10'

### 1.1.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN selon leur taille. Après une PCR « gene targeting », la migration des fragments d'ADN obtenus permet de voir si la PCR a correctement fonctionné. Dans le cas des PCR sur colonies, l'électrophorèse sur gel d'agarose permet de détecter la présence du fragment d'ADN cible dans le génome des cellules d'une colonie.

Les fragments d'ADN sont visibles dans le gel grâce au bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il est excité par des rayons ultraviolets.

Méthode :

- Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 10 g d'agarose dans 1L de tampon TAE
- Couler le gel dans un support adéquat (avec un peigne pour les puits de chargement) et ajouter 5 µL de bromure d'éthidium pour 100 mL d'agarose avant la polymérisation du gel
- Après polymérisation du gel, placer le support dans une cuve d'électrophorèse et remplir celle-ci avec du tampon TAE 1X
- Retirer le peigne
- Charger les échantillons (ADN à détecter et le bleu de chargement) et un marqueur de taille (GeneRuler)
- Appliquer une différence de potentiel entre les deux bornes (environ 130 V) pendant environ 30 minutes
- Visualiser l'ADN dans le gel sous des rayons ultraviolets

## 1.2 Purification des produits PCR

Avant de réaliser une transformation (introduction d'un fragment d'ADN dans une cellule vivante), les fragments d'ADN issus de PCR « gene targetting » doivent être purifiés. Pour cela, nous utilisons le kit Quiagen « QIAquick PCR purification kit ». La méthode utilisée par le kit est composée de trois étapes : Liaison de l'ADN sur la colonne de purification, lavage de l'ADN fixé et enfin élution d'un fragment purifié et prêt à être transformé.

## 1.3 Transformation de levures

La transformation a pour but l'introduction d'ADN exogène dans les levures rendues compétentes.

Méthode :

- Inoculer une culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5
- Culotter les cellules ( $10^8$  par transformation)
- Resuspendre le culot avec 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre le culot avec 1 mL de LiAc-TE
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 100 µL de LiAc-TE
- Ajouter 2,5 µL d'ADN de sperme de saumon bouilli 5 minutes (10 mg/mL)
- Ajouter 15 µL de l'ADN que l'on veut insérer
- Laisser à température ambiante pendant 10 minutes
- Ajouter 260 µL de PEG/LiAc-TE 40%
- Laisser à température ambiante pendant 30 minutes
- Ajouter 43 µL de DMSO
- Choc thermique à 42°C pendant 5 minutes
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre le culot avec 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre dans 300 µL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Etaler 100 µL sur boîte YES (Yeast extract supplemented medium) + agar à l'aide de billes de verre
- Le lendemain, répliquer les boîtes sur milieu sélectif

## 1.4 Croisement

En condition de carence en nutriments, deux souches de *S. pombe* de mating type différents (h+/h-) peuvent conjuguer. Pour croiser deux souches, il suffit de prendre un peu de cellules d'une souche et les mélanger avec des cellules de l'autre souche sur milieu « Malt extract ». Après deux à trois jours à 25°C, des asques contenant quatre spores sont visibles. Les spores contenues dans les asques peuvent être analysées soit par dissection des tétrades soit par « random spore analysis ». Les nouvelles colonies peuvent être alors vérifiées par PCR sur colonies.

Random spore analysis

- Croisement
- Prendre l'équivalent d'une anse de cellules et les resuspendre dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Ajouter 2 µL d'hélicase (*Helix pomatia* juice) (Biosepra) pour digérer la paroi des tétrades et tuer les cellules végétatives alors que les spores, grâce à leur paroi plus épaisse, sont résistantes
- Incuber à 25°C overnight
- Centrifuger 15 secondes à 13000 rpm
- Resuspendre le culot dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Etaler sur boîte 1 µL du mélange sur milieu sélectif
- Laisser incuber à 32°C jusqu'à ce que les spores forment des colonies

## 2 Méthodes relatives aux protéines

### 2.1 Extraction des protéines totales

Cette méthode rapide permet une extraction protéique totale et est réalisée selon le protocole de Matsuo et al (Matsuo et al., 2006).

Méthode :

- Inoculer une culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5
- Culotter 10 mL de la culture liquide
- Resuspendre le culot avec 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre le culot avec 0,300 mL de H<sub>2</sub>O et ajouter 0,300 mL de NaOH 0,6M
- Laisser à température ambiante pendant 10 minutes
- Centrifuger 15 secondes à 10000 rpm. Evacuer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 70 µL de tampon de chargement
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 minutes
- Conserver les échantillons à -20°C

### 2.2 Immunoprécipitation et coimmunoprécipitation

La technique de l'immunoprécipitation permet la précipitation de protéines à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à des billes d'agarose. Pour réaliser une coimmunoprécipitation, une souche, dont les deux protéines cibles sont taggées, est utilisée.

L'immunoprécipitation est réalisée sur la première protéine cible. Ensuite, les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE et la seconde protéine est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique du tag par cette protéine par Western Blot.

Méthode :

*Lavage des cellules*

- Inoculer une culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5

- Récupérer 50 mL de la culture
- Culotter les cellules
- Resuspendre le culot dans 1 mL de tampon NP40 + inhibiteurs de protéases (EDTA free) (Roche) froid
- Transférer dans un tube de 10 mL
- Centrifuger 4 minutes à 5000 rpm à 4°C

*Lyse des cellules et extraction des protéines solubles*

- Evacuer le surnageant
  - Lyse au vortex
    - Resuspendre dans 30 µL de tampon NP40+PI froid
    - Ajouter l'équivalent de 1,5 mL de billes de Zirconium (Biospec)
    - Vortexer 5 X 30 secondes à 4°C
    - Ajouter 1 mL de tampon NP40+PI froid pour rincer les billes
    - A l'aide d'une aiguille chauffée, faire un petit trou dans le fond du tube et placer directement ce tube dans un tube de 50 mL avec un capuchon troué
    - Centrifuger 2 minutes à 2000 rpm à 4°C
  - Lyse au Fast Prep
    - Resuspendre dans 200 µL de tampon NP40+PI froid et transférer dans un eppendorf à capuchon vissé
    - Ajouter l'équivalent de 1 mL de billes de Zirconium
    - Lyser à l'aide du Fast prep en chambre froide (vitesse 6 2 X 20 secondes)
    - A l'aide d'une aiguille chauffée, faire un petit trou dans le fond tube et placer directement ce tube dans un eppendorf normal
    - Centrifuger 2 minutes à 2000 rpm à 4°C
    - Rajouter dans l'eppendorf du tampon NP40+PI froid pour atteindre 1 mL
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant

*Préparation des billes pour l'immunoprécipitation*

- Pour les billes IgG anti-HA
  - Laver les billes trois fois avec 1 mL de PBS froid
  - Laisser 500 µL de PBS froid et ajouter 1 µL d'anticorps anti-HA
  - Laisser incuber 30 minutes à 30°C sur plaque vibrante
  - Laver deux fois les billes avec 1 mL de PBS froid
  - Laver une fois les billes avec 1 mL de tampon NP40+PI froid
  - Laisser les billes dans un volume égal de tampon NP40+PI froid au volume de billes de départ
- Pour les billes IgG anti-TAP
  - Laver les billes trois fois avec 1 mL de PBS froid
  - Laver une fois les billes avec 1 mL de tampon NP40+PI froid
  - Laisser les billes dans un volume égal de tampon NP40+PI froid au volume de billes de départ

*Immunoprécipitation*

- Ajouter 50 µL de billes + tampon à chaque échantillon
- Mélanger sur roue pendant 2 heures à 4°C
- Laver les billes trois fois dans 1 mL de tampon IPP150
- Laisser 30 µL de tampon IPP150
- Resuspendre les billes dans 30 µL de tampon de chargement 2X
- Chauffer 5 minutes à 100°C (les protéines précipitées se dénaturent et se détachent des billes)
- Récupérer le surnageant



- Conserver les échantillons à -20°C

## 2.3 Electrophorèse SDS-PAGE et Western Blot

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La technique de Western Blot permet la détection spécifique de protéines dans un extrait cellulaire. Cela implique le transfert des protéines séparées sur le gel sur une membrane de PVDF. Cette membrane est ensuite mise en présence d'anticorps qui vont reconnaître les protéines cibles de manière spécifique. Grâce à une enzyme peroxydase couplée à un anticorps secondaire, le luminol, présent dans la solution du kit de révélation utilisé, est oxydé et émet alors de la lumière détectable à l'aide d'un film photographique.

Méthode :

*Monter le dispositif*

*Couler le gel*

- Gel « running » (10%) : 8,2 mL H<sub>2</sub>O  
6,6 mL Acrylamide bis 30% (Biorad)  
5 mL Tris 0,5 M pH 8,8  
0,2 ml APS 10%  
0,01 ml Temed (Sigma)
- Gel « stacking » : 3 mL H<sub>2</sub>O  
0,67 mL Acrylamide bis 30%  
1,25 mL Tris 0,5 M pH 6,8  
0,075 mL APS 10%  
0,005 mL Temed

*Migration*

- Remplir la cuve inférieure avec environ 250 mL de tampon running SDS-PAGE
- Charger les échantillons et le marqueur de taille (low range-Biorad)
- Placer la cuve supérieure et la remplir avec environ 250 mL de tampon running SDS-PAGE
- Démarrer l'électrophorèse (400 V, 44 mA) pendant environ 1h20

*Transfert sur membrane*

- Activer la membrane PVDF (Millipore) dans du méthanol
- Humidifier les papiers Watman épais dans du tampon Towbin
- Rincer la membrane PVDF activée dans du tampon Towbin
- Faire le montage de bas en haut : 2 papiers Watman humidifiés, la membrane, le gel de migration, 2 papiers Watman humidifiés
- Fermer l'appareil de transfert et transférer avec 120 mA pendant 45 minutes

*Bloquage de la membrane*

- Mettre la membrane dans 50 mL de PBS tween (10%) (Biorad) avec 2,5 g de lait en poudre pendant 1h

*Incubation avec l'anticorps primaire*

- Retirer le lait et n'en laisser que 10 mL
- Ajouter 10 µL d'anticorps primaire (dilution 1/1000)
- Laisser 1h sur l'agitateur
- Laver 3 x pendant 15 minutes avec du PBS tween (10%)

*Incubation avec l'anticorps secondaire*

- Mettre la membrane en présence de 5  $\mu$ L d'anticorps secondaire et 10 mL de lait (dilution 1/2000) pendant environ 30 minutes
- Laver 2 x pendant 15 minutes avec du PBS tween (10%)
- Laver 1x pendant 15 minutes avec du PBS

#### Révélation

- Mélanger 2,5 ml de solution 1 et 2,5 ml de solution 2 du kit Western Chemiluminescence Reagent Plus de Perkin Elmer
- Déposer sur la membrane les 5 ml du mélange, laisser incuber 1 minute
- Placer la membrane sur un papier épais et disposer du papier film (Saran) autour
- Aller en chambre noire
- Exposer le film photo sur la membrane pendant différents temps (7 secondes, 15 secondes, 30 secondes, 1 minute, 2 minutes et 4 minutes)
- Développer le film

## 2.4 Test d'activité kinase

Le test kinase vise à détecter l'activité kinase d'une enzyme sur un substrat spécifique en ajoutant de l'ATP dont le phosphate en position gamma est radiomarqué par la présence d'un isotope  $^{32}$  du phosphore. Dans notre cas, ce test permet de voir l'activité kinase de Cdk11 sur le domaine C-terminal de la plus grosse sous-unité de la polymérase II. Cette méthode comprend trois étapes:

- Lyse des cellules et extraction des protéines solubles
- Immunoprécipitation de Cdk11
- Test kinase

Pour produire la fusion GST-CTD utilisée comme substrat, un fragment encodant le CTD de *S. pombe* a été amplifié par PCR et cloné dans le pGEX4T1 (GE-Amersham-Pharmacia) en fusion avec le module GST. La protéine de fusion de 48 kDa a été produite dans la souche BL21 d'*E. coli*, purifiée sur Gluthatione Sepharose et dosée en suivant les instructions du fabricant (Monique Dewez et Damien Hermand, communication personnelle).

#### Méthode :

##### *Lavage des cellules*

- Inoculer une culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5
- Récupérer 50 mL de la culture
- Culotter les cellules
- Resuspendre le culot dans 1 mL de tampon NP40 + inhibiteurs de protéases froid
- Transférer dans un tube de 10 mL
- Centrifuger 4 minutes à 5000 rpm à 4°C

##### *Lyse des cellules et extraction des protéines solubles*

- Evacuer le surnageant
- Resuspendre dans 30  $\mu$ L de tampon NP40+PI froid
- Ajouter l'équivalent de 1,5 mL de billes de Zirconium
- Vortexer 5 X 30 secondes à 4°C
- Ajouter 1 ml de tampon NP40+PI froid pour rincer les billes
- A l'aide d'une aiguille chauffée, faire un petit trou dans le fond tube et placer directement ce tube dans un tube de 50 mL avec capuchon troué
- Centrifuger 2 minutes à 2000 rpm à 4°C

- Récupérer les protéines solubles
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant

#### *Préparation des billes pour l'immunoprécipitation*

- Pour les billes IgG anti-HA
  - Laver les billes trois fois avec 1 mL de PBS froid
  - Laisser 500 µL de PBS froid et ajouter 1 µL d'anticorps anti-HA
  - Laisser incubé 30 minutes à 30°C sur plaque vibrante
  - Laver deux fois les billes avec 1 mL de PBS froid
  - Laver une fois les billes avec 1 mL de tampon NP40+PI froid
  - Laisser les billes dans un volume égal de tampon NP40+PI froid au volume de billes de départ
- Pour les billes IgG anti-TAP
  - Laver les billes trois fois avec 1 mL de PBS froid
  - Laver une fois les billes avec 1 mL de tampon NP40+PI froid
  - Laisser les billes dans un volume égal de tampon NP40+PI froid au volume de billes de départ

#### *Immunoprécipitation*

- Ajouter 50 µL de billes + tampon à chaque échantillon
- Mélanger sur roue pendant 2 heures à 4°C
- Laver les billes trois fois dans 1 mL de tampon IPP150
- Laver une fois les billes avec 1 mL de tampon kinase

#### *Test kinase*

- Ajouter aux billes la solution pour la réaction kinase (22 µL de tampon kinase, 1 µL d'ATP marqué radioactivement, 2 µL de GST-CTD (substrat) par test kinase)
- Laisser incubé 30 minutes à 30°C
- Récupérer le surnageant et ajouter 25 µL de tampon de chargement 2X
- Conserver les échantillons à -20°C
- Réaliser une électrophorèse SDS-PAGE
- Récupérer le gel, sur lequel les protéines ont été séparées, sur sa plaque de verre et les emballer dans du papier film (Saran)
- Disposer un film photo sur le gel emballé dans une cassette
- Placer la cassette à -80°C durant le temps d'exposition voulu
- Révéler le film

## **2.5 Purification TAP**

La purification TAP (Tandem affinity purification) est une méthode permettant une purification rapide de complexes protéiques (Puig et al., 2001). Ce type de purification nécessite l'ajout d'un TAP tag en C-terminal de la protéine d'intérêt. En purifiant cette protéine, il est possible de détecter des protéines co-purifiées qui formeraient potentiellement un complexe avec la protéine d'intérêt. Pour identifier ces protéines co-purifiées, il faut alors faire migrer sur un gel SDS-PAGE les fractions d'élutions récupérées après la purification et analyser ensuite les différentes bandes obtenues par spectrométrie de masse.

Méthode :

#### *Traitement et lyse des cellules*

- Inoculer 12 L de culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5

- Centrifuger et laver les cellules avec H<sub>2</sub>O stérile
- Centrifuger et récupérer le culot avec une petite cuillère et le mettre dans une seringue
- Appuyer délicatement sur le piston pour que les cellules tombent dans l'azote liquide sous forme de « spaghettis »
- Conserver au -80°C
- Répartir les cellules gelées dans 12 tubes (15 mL)
- Ajouter 2 mL de tampon NP-40 + PI et l'équivalent de 4 mL de billes de Zirconium
- Lyse au Fast prep 8 X 30 secondes (vitesses 6,5)
- A l'aide d'une aiguille chauffée, faire un petit trou dans le fond tube et placer directement ce tube dans un tube de 50 mL avec capuchon troué
- Centrifuger 1 minute à 2000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 2 mL de tampon NP-40 + PI sur les billes
- Centrifuger 1 minute à 2000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant et séparer l'ensemble des surnageants dans 2 tubes de 50 mL
- Centrifuger le surnageant total pendant 10 minutes à 5000 rpm à froid
- Transférer le surnageant dans les tubes Beckman et ultracentrifuger à 38000 rpm à froid pendant 45 minutes
- Récupérer les surnageants et les mettre dans 2 tubes de 50 mL

#### *Préparer les billes d'agarose IgG*

- Laver 3 X 1 mL de billes avec le tampon NP40 + PI froid
- Laisser 400 µL de billes dans chaque Falcon sur roue à 4°C pendant 1 heure

#### *Purification*

- Verser le contenu des 2 tubes de 50 mL sur une colonne BioRad Poly-Prep Chromatography (0,8X4 cm)
- Laver les colonnes avec 3X10 mL de tampon IPP150 froid
- Laver les billes avec 10 mL de tampon TEV
- Fermer le fond de la colonne et ajouter 1 mL de tampon TEV avec 500 U de la TEV protéase
- Laisser la colonne sur roue pendant 1h30 à 16°C
- Récupérer ce qui se trouve dans la colonne et le mettre dans une nouvelle colonne
- Laver l'ancienne colonne avec 1 mL de tampon TEV (transférer dans la nouvelle colonne)
- Ajouter 5,4 mL de CBB (3 volumes) et 5,4 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M.
- Ajouter 300 µL de billes Calmodulin resin et laisser incuber sur la roue pendant 1 h à 4°C
- Laver les billes 1X avec 1 mL de CBB 0,1% et 1 X avec 1 mL de CBB 0,02%
- Eluer avec 3X 200 µL de CEB

## Bibliographie

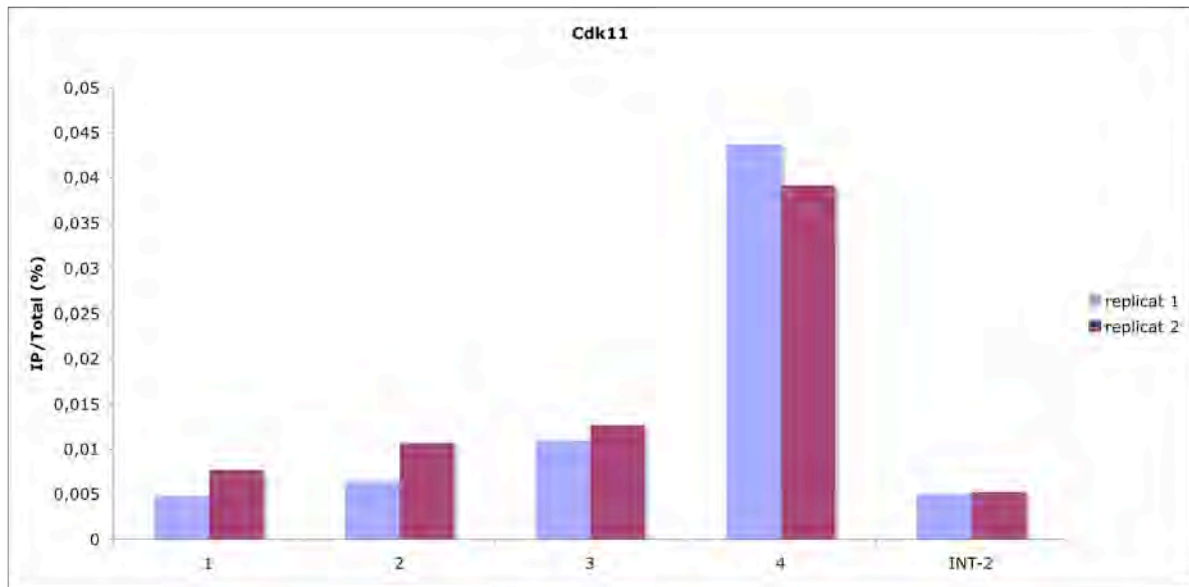
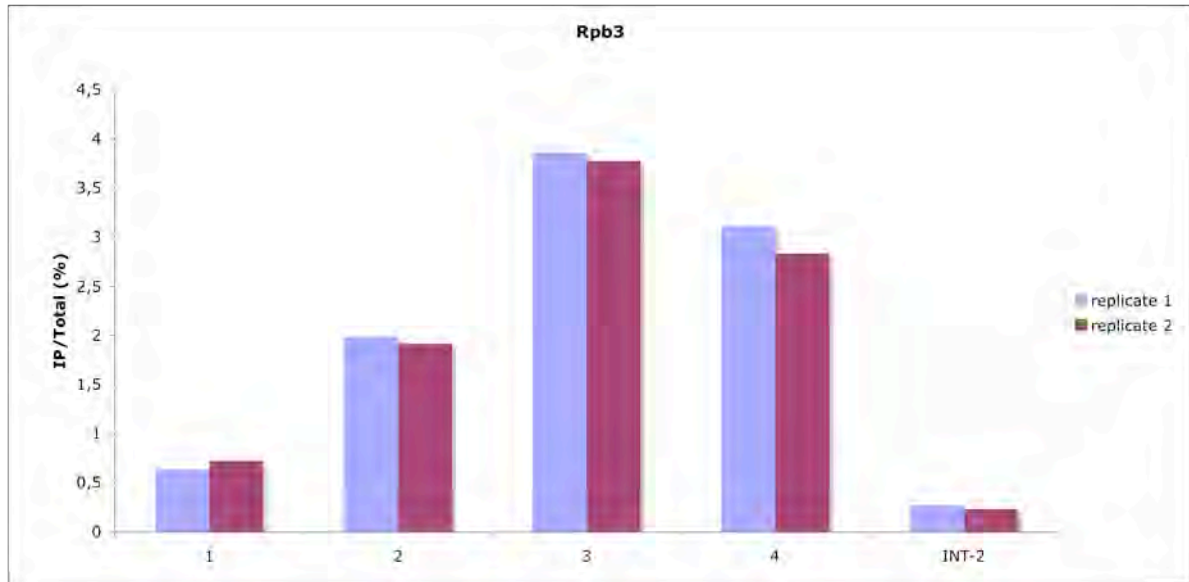
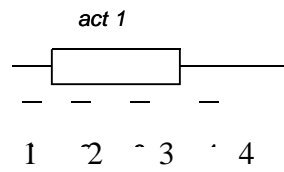
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Bentley, D. (2002) The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 336-342.
- Borgne, A. and Meijer, L. (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem*, **271**, 27847-27854.
- Buck, V., Russell, P. and Millar, J.B. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J*, **14**, 6173-6183.
- Cagas, P.M. and Corden, J.L. (1995) Structural studies of a synthetic peptide derived from the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *Proteins*, **21**, 149-160.
- Cantin, G.T., Stevens, J.L. and Berk, A.J. (2003) Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12003-12008.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S. and Beyaert, R. (2000) Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell*, **5**, 597-605.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.
- Dahmus, M.E. (1994) The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **48**, 143-179.
- Damagnez, V., Makela, T.P. and Cottarel, G. (1995) Schizosaccharomyces pombe Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *Embo J*, **14**, 6164-6172.
- Dickinson, L.A., Edgar, A.J., Ehley, J. and Gottesfeld, J.M. (2002) Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, **277**, 25465-25473.
- Fisher, R.P., Jin, P., Chamberlin, H.M. and Morgan, D.O. (1995) Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell*, **83**, 47-57.
- Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1996) CAK in TFIIF: crucial connection or confounding coincidence? *Biochim Biophys Acta*, **1288**, 07-10.
- Fuller-Pace, F.V. (2006) DEXD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4206-4215.
- Gururajan, R., Lahti, J.M., Grenet, J., Easton, J., Gruber, I., Ambros, P.F. and Kidd, V.J. (1998) Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2. *Genome Res*, **8**, 929-939.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998) Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev*, **12**, 357-369.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S. and Young, R.A. (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, **2**, 43-53.
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2003) CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, **278**, 8623-8629.
- Ishihama, A., Kimura, M. and Mitsuzawa, H. (1998) Subunits of yeast RNA polymerases: structure and function. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 190-196.
- Johnson, K.M. and Carey, M. (2003) Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. *Curr Biol*, **13**, 772-777.

- Kaufer, N.F. and Potashkin, J. (2000) Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3003-3010.
- Kim, J.B. and Sharp, P.A. (2001) Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem*, **276**, 12317-12323.
- Kim, T.K., Ebright, R.H. and Reinberg, D. (2000) Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science*, **288**, 1418-1422.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599-608.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J. and Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*, **14**, 2452-2460.
- Kornberg, R.D. (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 235-239.
- Lahti, J.M., Xiang, J., Heath, L.S., Campana, D. and Kidd, V.J. (1995a) PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Mol Cell Biol*, **15**, 1-11.
- Lahti, J.M., Xiang, J. and Kidd, V.J. (1995b) The PITSLRE protein kinase family. *Prog Cell Cycle Res*, **1**, 329-338.
- Laybourn, P.J. and Dahmus, M.E. (1989) Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit IIa/o. *J Biol Chem*, **264**, 6693-6698.
- Li, T., Inoue, A., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2004) Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development. *Mol Cell Biol*, **24**, 3188-3197.
- Liu, J. and Kipreos, E.T. (2000) Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa [In Process Citation]. *Mol Biol Evol*, **17**, 1061-1074.
- Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T. and Katayama, S. (2006) A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1992-1994.
- Max, T., Sogaard, M. and Svejstrup, J.Q. (2007) Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *J Biol Chem*, **282**, 14113-14120.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P. (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes Dev*, **19**, 1401-1415.
- Meredith, G.D., Chang, W.H., Li, Y., Bushnell, D.A., Darst, S.A. and Kornberg, R.D. (1996) The C-terminal domain revealed in the structure of RNA polymerase II. *J Mol Biol*, **258**, 413-419.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-291.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **10**, 2657-2683.
- Palancade, B. and Bensaude, O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem*, **270**, 3859-3870.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T. and Price, D.H. (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev*, **12**, 755-762.
- Petretti, C., Savoian, M., Montembault, E., Glover, D.M., Prigent, C. and Giet, R. (2006) The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep*, **7**, 418-424.

- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, **308** (Pt 3), 697-711.
- Price, D.H. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **20**, 2629-2634.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501-512.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
- Ram, O. and Ast, G. (2007) SR proteins: a foot on the exon before the transition from intron to exon definition. *Trends Genet*, **23**, 5-7.
- Roeder, R.G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett*, **579**, 909-915.
- Sachs, N.A. and Vaillancourt, R.R. (2003) Cyclin-dependent kinase 11(p110) activity in the absence of CK2. *Biochim Biophys Acta*, **1624**, 98-108.
- Sayani, S., Janis, M., Lee, C.Y., Toesca, I. and Chanfreau, G.F. (2008) Widespread impact of nonsense-mediated mRNA decay on the yeast intronome. *Mol Cell*, **31**, 360-370.
- Schwartz, L.B. and Roeder, R.G. (1975) Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase II from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. *J Biol Chem*, **250**, 3221-3228.
- Shokat, K. and Velleca, M. (2002) Novel chemical genetic approaches to the discovery of signal transduction inhibitors. *Drug Discov Today*, **7**, 872-879.
- Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D. (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, **18**, 2437-2468.
- Spangler, L., Wang, X., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Dvir, A. (2001) TFIIF action in transcription initiation and promoter escape requires distinct regions of downstream promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5544-5549.
- Stalder, L. and Muhlemann, O. (2008) The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol*, **18**, 315-321.
- Svejstrup, J.Q. (2004) The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 64-73.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Thompson, N.E., Steinberg, T.H., Aronson, D.B. and Burgess, R.R. (1989) Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **264**, 11511-11520.
- Trembley, J.H., Hu, D., Hsu, L.C., Yeung, C.Y., Slaughter, C., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2002) PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. *J Biol Chem*, **277**, 2589-2596.
- Trembley, J.H., Hu, D., Slaughter, C.A., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (2003) Casein kinase 2 interacts with cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in vivo and phosphorylates both the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain and CDK11 in vitro. *J Biol Chem*, **278**, 2265-2270.
- van den Heuvel, S. and Harlow, E. (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, **262**, 2050-2054.

- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. and Handa, H. (1998) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo J*, **17**, 7395-7403.
- Wang, W., Carey, M. and Gralla, J.D. (1992) Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science*, **255**, 450-453.
- Wu, S.Y., Zhou, T. and Chiang, C.M. (2003) Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol*, **23**, 6229-6242.
- Xiang, J., Lahti, J.M., Grenet, J., Easton, J. and Kidd, V.J. (1994) Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *J Biol Chem*, **269**, 15786-15794.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
- Yokoyama, H., Gruss, O.J., Rybina, S., Caudron, M., Schelder, M., Wilm, M., Mattaj, I.W. and Karsenti, E. (2008) Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *J Cell Biol*, **180**, 867-875.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A. and Hahn, S. (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, **408**, 225-229.
- Zhang, J. and Corden, J.L. (1991) Phosphorylation causes a conformational change in the carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem*, **266**, 2297-2302.
- Zhang, S., Cai, M., Zhang, S., Xu, S., Chen, S., Chen, X., Chen, C. and Gu, J. (2002) Interaction of p58(PITSLRE), a G2/M-specific protein kinase, with cyclin D3. *J Biol Chem*, **277**, 35314-35322.
- Zong, H., Li, Z., Liu, L., Hong, Y., Yun, X., Jiang, J., Chi, Y., Wang, H., Shen, X., Hu, Y., Niu, Z. and Gu, J. (2005) Cyclin-dependent kinase 11(p58) interacts with HBO1 and enhances its histone acetyltransferase activity. *FEBS Lett*, **579**, 3579-3588.



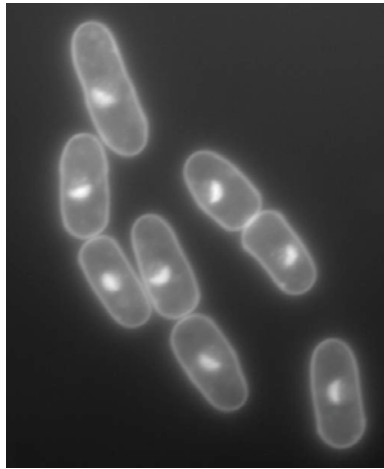


**Figure 22.** (A) Schéma représentant le locus d'act1, l'ORF étant représentée par un rectangle et les produits PCR par les barres en dessous du gène. (B) Analyse ChIP de Rpb3 sur le locus act1. (C) Analyse ChIP de Cdk11 sur le locus act1.

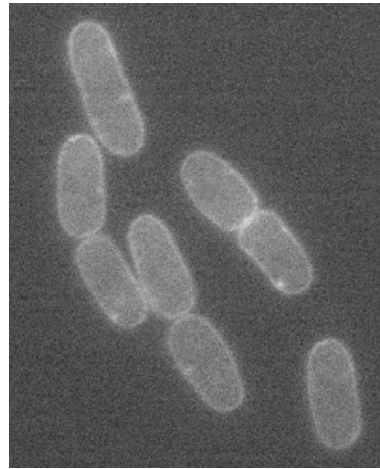
Pour B et C, l'ordonnée représente le ratio produit immunoprécipité sur total (%IP/total). Pour chaque expérience, une région intergénique du chromosome II est utilisée comme contrôle négatif. Les expériences ont été réalisées en duplicat biologique.

**A**

DAPI



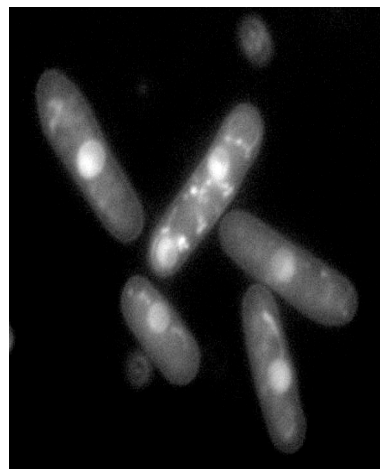
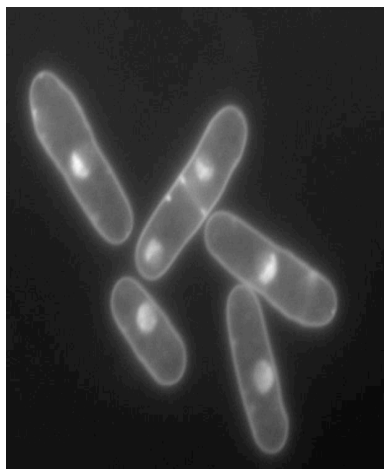
GFP

**B**

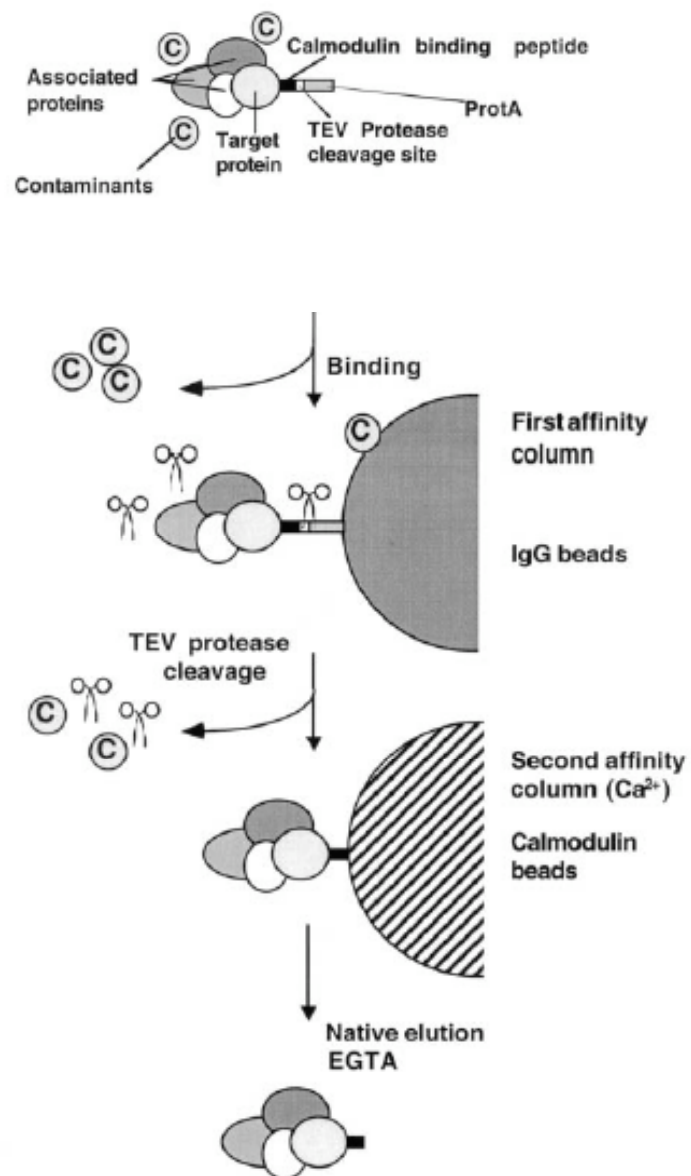
DAPI



GFP



**Figure 12.** Microscopie à fluorescence pour des cellules colorées au DAPI. (A) Contrôle : souche non taggée observée au microscope à fluorescence. (B) Souche cdk11-GFP observée au microscope à fluorescence.



**Figure 15.** Schéma de la stratégie de la purification TAP (d'après Puig et al., 2001)